

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在鉴定儿童血流感染少见苍白杆菌的应用及耐药情况分析

刘健龙, 郭宽鹏, 李先斌, 宋春荣, 胡琼, 唐喜春

湖南省儿童医院检验中心, 长沙 410007

摘要: 目的 快速鉴定和分析儿童血流感染少见苍白杆菌及其耐药情况分析。方法 收集某儿童医院儿童血流感染的临床标本中分离的苍白杆菌 26 株, 运用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 技术, 对其进行检测, 并结合测序结果分析确定菌株; 根据药敏实验结果, 用 PCR 法分析其耐药情况。结果 26 株实验菌株最后通过 MALDI-TOF MS 和 16S rRNA 基因测序技术, 有 25 株被鉴定为解糖精假苍白杆菌, 药敏结果显示它们对哌拉西林/他唑巴坦、喹诺酮类、氨基糖苷类和复方新诺明的耐药率为 0.0%。而对氨曲南耐药率为 100.0%, 其他 β -内酰胺类抗菌药物有不同的耐药率。AmpC 和 AmpR 耐药基因检测均为阴性。结论 MALDI-TOF MS 能够快速鉴定临床少见苍白杆菌, 儿童血流感染的解糖精假苍白杆菌不产头孢菌素酶, 结合药敏分析结果及儿童用药特点, 建议使用哌拉西林/他唑巴坦。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 鉴定; 苍白杆菌; 耐药

中图分类号: R378 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2021)07-0818-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2021.07.012

Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to identification of rare *Ochrobactrum* in children with bloodstream infection and analysis of the drug-resistance

LIU Jian-long, GUO Kuan-peng, LI Xian-bin, SONG Chun-rong, HU Qiong, TANG Xi-chun

Center of Clinical Laboratory Medicine, Hunan Children's Hospital, Changsha, Hunan 410007, China

Corresponding author: GUO Kuan-peng, E-mail: 52314@163.com

基金项目: 湖南省卫生健康委员会面上项目(C2019016)

作者简介: 刘健龙(1978-), 男, 湖南湘乡人, 副主任医师, 主要从事微生物研究工作。

通信作者: 郭宽鹏, E-mail: 52314@163.com。

参考文献

- [1] 尹诗九, 钟航, 李锐博, 等. Crowe III 型髋关节发育不良人工全髋关节置换术中自体股骨头结构植骨重建髋臼疗效分析[J]. 中国修复重建外科杂志, 2018, 32(1): 20-24.
- [2] 程琪, 郭开今, 赵凤朝, 等. 全髋关节置换术中髋臼假体周围骨折的危险因素分析及处理[J]. 中华骨科杂志, 2018, 38(11): 641-649.
- [3] 中华医学会小儿外科分会骨科学组, 中华医学会骨科学分会小儿创伤矫形学组. 发育性髋关节发育不良临床诊疗指南(0~2 岁)[J]. 中华骨科杂志, 2017, 37(11): 641-650.
- [4] 胥少汀, 葛宝丰, 徐印坎. 实用骨科学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2012: 1401.
- [5] 刘玲玲, 高月, 李琦, 等. 发育性髋关节发育不良磁共振检查的研究进展[J]. 中国临床医学影像杂志, 2017, 28(12): 893-896.
- [6] 俞洋, 舒玲, 鲍丙莉, 等. 婴儿 42 d 常规体检髋关节超声筛查结果及相关因素分析[J]. 中国初级卫生保健, 2018, 32(5): 36-37, 48.
- [7] 吴宝杰, 余升华, 陈惠润, 等. 广州市区新生儿及 6 个月内婴儿发育性髋关节发育不良患病率的超声筛查[J]. 岭南现代临床外科, 2017, 17(6): 714-717.
- [8] 李坛珠, 杨晓东, 冯祥, 等. 日喀则市藏族发育性髋关节发育不良儿童患病率临床研究[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2016, 13(1): 38-40.
- [9] 付绍婷, 王晓慧. 雄激素和雄激素受体对骨代谢的调控及机制研究进展[J]. 中国细胞生物学报, 2018, 40(6): 1041-1048.
- [10] 张淑敏, 陈涛, 郭稳, 等. 股骨头覆盖率在婴儿发育性髋关节发育不良治疗随访中的价值初探[J]. 中华超声影像学杂志, 2018, 27(6): 515-519.
- [11] 常小丽, 王毅. 发育性髋关节脱位发病相关因素的研究进展[J]. 中华小儿外科杂志, 2016, 37(12): 953-957.
- [12] 宋敏, 王艳香. 胎臀位外倒转术的实施孕周及成功影响因素分析[J]. 中国现代医生, 2019, 57(11): 71-74.
- [13] 梁馨月, 张大龙, 李蓉, 等. 孕产期因素与发育性髋关节发育不良的相关性分析[J]. 医学理论与实践, 2019, 32(3): 327-329, 342.
- [14] 徐明民, 朱文军, 季斌, 等. 超声评估 1~3 个月龄臀纹不对称婴儿两侧髋关节发育差异性[J]. 中国超声医学杂志, 2015, 31(3): 247-249.
- [15] 汪杰, 蒋式飞. 婴幼儿发育性髋关节发育不良情况调查与防治对策研究[J]. 中国地方病防治杂志, 2016, 31(6): 658-659.

收稿日期: 2020-12-14

Abstract: **Objective** To rapidly identify and analyze rare *Ochrobactrum* and its drug-resistance situation in children with bloodstream infection. **Methods** We collected 26 strains of *Ochrobactrum* isolated from clinical specimens from children with bloodstream infection in a children's hospital. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) was used to detected the strains, and then they were identified based on biochemical phenotype and gene sequencing analysis. According to the results of drug susceptibility test, the drug-resistance genes were analyzed by PCR method. **Results** Among the 26 strains detected by MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene sequencing, 25 strains were identified as *Pseudochrobactrum saccharolyticum*. Drug sensitivity results showed that their resistance rates to piperacillin/tazobactam, quinolones, aminoglycosides and cotrimoxazole were 0, but their resistance rate to amriaxone was 100%. The other β -lactam antibacterial drugs had different drug-resistance rates. AmpC and AmpR gene tests were negative. **Conclusion** MALDI-TOF MS can rapidly identify clinical rare *Ochrobactrum*. The strains of *Pseudochrobactrum saccharolyticum* isolated from children with bloodstream infection do not contain AmpC or AmpR resistance genes. It is recommended to use piperacillin/tazobactam based on the results of drug sensitivity analysis combined with the characteristics of medication in children.

Keywords: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; identification; *Ochrobactrum*; drug resistance

苍白杆菌 (*Ochrobactrum*) 是一种非发酵菌, 可从环境和几乎所有的临床标本中分离到, 目前最主要的临床表现是引起导管相关性血流感染, 此外, 还可引起腹膜炎、骨髓炎、化脓性关节炎、感染性心内膜炎、软组织感染、人工晶状体植入术后眼内炎等^[1]。目前, 人们发现 Vitek 2 Compact 仪器鉴别苍白杆菌属存在一定的局限性, 导致某些临床少见的苍白杆菌不能鉴别出来, 而国内开展 16S rRNA 基因测序的医院还很少, 所以本次研究运用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS), 对临床分离的 26 株临床少见苍白杆菌进行检测, 并结合测序结果分析确定菌株; 根据药敏实验结果, 用 PCR 法分析其耐药基因, 为少见苍白杆菌感染的快速诊断和治疗提供参考。

1 材料与方法

- 1.1 菌株来源 收集某儿童医院确诊血流感染患儿中分离的经 Vitek 2 Compact 仪器法鉴定为人苍白杆菌菌株 26 株。
- 1.2 主要仪器和试剂 Vitek 2 Compact 全自动鉴定药敏仪、VITEK MS 质谱仪、VITEKMS-DS target slides 一次性靶板、VITEK MS CHCA 基质 α -氰基-4-羟基肉桂酸+乙腈 (购自法国生物梅里埃公司)。ABI Veriti 96 孔热循环仪 (美国 ABI 公司); TaqTM 酶体系、DL 2000 Marker 和细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (大连 TaKaRa 公司); 引物合成及测序由上海生工生物工程公司完成; 蛋白酶 K (美国 Sigma 公司); 质控菌株: 大肠埃希菌 ATCC8739。
- 1.3 MALDI-TOF MS 鉴定 按照仪器说明书操作,

将待测菌株及校准菌株大肠埃希菌 ATCC8739 均匀涂在靶板的检测点及校准点位上, 把金属靶板上机检测, 所得蛋白质峰图与 MALDI-TOFMS 科研库的数据库进行比较计算, 从而给出鉴定结果。VITEK MS 鉴定结果可信水平 >99.00% 为可接受的结果。

1.4 细菌的 recA 基因和 16SrRNAPCR 扩增及测序 按照试剂说明书提取细菌基因组 DNA。根据参照文献^[2-3]合成 recA 和 16S rRNA 基因引物, 序列见表 1。recA 基因的扩增参数如下: 94℃ 5 min 预变性; 94℃ 30 s 变性, 54℃ 30 s 退火, 72℃ 1 min 延伸, 32 个循环; 72℃ 7 min 延伸; 16SrRNA 基因扩增参数如下: 94℃ 5 min 预变性; 94℃ 30 s 变性, 52℃ 30 s 退火, 72℃ 1 min 延伸, 35 个循环; 72℃ 7 min 延伸。扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察, 送上海生工生物工程公司进行双向测序。recA 基因测序结果用 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行序列比对, 16S rRNA 基因测序结果用 EzTaxon 数据库 (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) 进行序列比对。recA 基因序列比对结果的解释参考文献^[2-4], 16SrRNA 基因序列比对结果的解释参考 CLSI MM18-A 通用解释标准相关内容^[5]。

表 1 recA 和 16S rRNA 基因引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	产物长度 (bp)
16S rRNA	F: AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	1 500
	R: GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	
rec A	F: ATG TCT CAA AAT TCA TTG CGA C	167
	R: AGC ATC TTC TTC CGG TCC GC	

1.5 细菌药敏结果及耐药基因检测 采用 Vitek 2 Compact 全自动鉴定药敏仪检测细菌药敏情况。按照试剂盒说明书提取细菌基因组 DNA。靶基因引物序

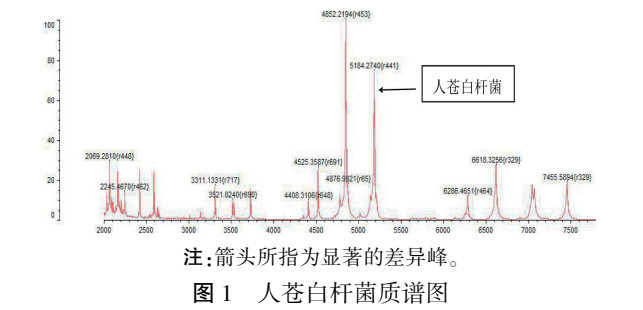
列和目的产物长度^[12]见表 2。PCR 扩增热循环参数如下:94 ℃ 5 min 预变性;94 ℃ 60 s 变性,50 ℃ 60 s 退火,72 ℃ 1 min 延伸,30 个循环;72 ℃ 7 min 延伸。PCR 产物经 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳,出现与 DNA Mark 对照分子相当的目的条带为阳性。

表 2 耐药基因 PCR 引物及扩增产物

基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
AmpC	F:CGC CAG CGC AAG TAT CGT AT	1 120
	R:CGC GCC TAT TGC TTG TTG TC	
AmpR	F: CTC AGT TGT TCG CGG CAT CT	1 318
	R: AAT AGC GGC AGT GGT GAG GA	

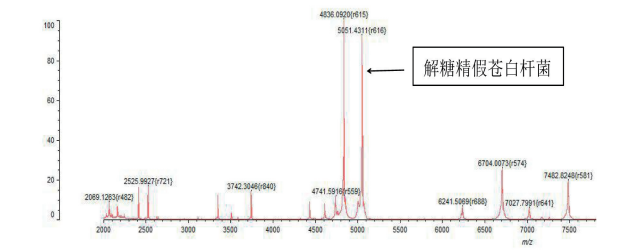
2 结 果

2.1 MALDI-TOF MS 菌种鉴定结果 此 26 株菌用法国生物梅里埃 Vitek 2 Compact 仪器法鉴定结果均为人苍白杆菌;运用 MOLDI-TOFMS 科研库检测,除 1 株无鉴定结果外,其余 25 株均为解糖精假苍白杆菌。人苍白杆菌的质谱图在 m/z 5184 处可见其特有的显著的峰图,而在解糖精假苍白杆菌的峰图中在 m/z 5051 处同样可观察到一个其特有的显著的峰图,由此可见 MALDI-TOFMS 能有效地将两种细菌进行区分,见图 1 和图 2。



注:箭头所指为显著的差异峰。

图 1 人苍白杆菌质谱图



注:箭头所指为显著的差异峰。

图 2 解糖精假苍白杆菌质谱图

2.2 基因测序结果 采用 16S rRNA 基因通用引物扩增,实验菌株中有 25 株扩增到靶基因,它们与解糖精假苍白杆菌的相似度为 100%,结合葡萄糖等糖类实验的结果,可进一步确认为解糖精假苍白杆菌^[4]。解糖精假苍白杆菌均没有扩增到 recA 目的基因。

2.3 药敏和耐药基因结果 25 株解糖精假苍白杆菌

中,哌啦西林/他唑巴坦、喹诺酮类、氨基糖苷类和复方新诺明的耐药率为 0.0%。而对氨曲南耐药率为 100.0%,其他 β-内酰胺类抗菌药物有不同的耐药率,见表 3。AmpC 基因和 AmpR 基因检测均为阴性。

表 3 25 株解糖精假苍白杆菌的耐药检测结果

抗菌药物	耐药例数	敏感例数	中介数	耐药率(%)
氨基糖苷类				
阿米卡星	0	24	1	0.0
庆大霉素	0	24	1	0.0
妥布霉素	0	25	0	0.0
喹诺酮类				
环丙沙星	0	25	0	0.0
左旋氧氟沙星	0	22	3	0.0
β-内酰胺类				
氨曲南	25	0	0	100.0
哌啦西林/他唑巴坦	0	24	1	0.0
头孢吡肟	2	23	0	8.0
头孢他啶	6	19	0	24.0
头孢曲松	6	19	0	24.0
亚胺培南	5	20	0	20.0
其他				
复方新诺明	0	25	0	0.0

3 讨 论

苍白杆菌为革兰染色阴性球杆菌,隶属于 α 变形菌目,布鲁菌科,与布鲁菌属关系密切。它存在于各种环境和人体,主要分离于导管相关的菌血症患者^[6],也有引起器官移植患者医院感染暴发的报道^[7]。尽管苍白杆菌属多为条件致病菌,但是有基因突变成高致病力菌株的可能性^[8]。

近年来,因病原体自身不断地进化以及菌属分类学的不断修订,VITEK2 Compact 鉴定仪 GN 鉴定卡的鉴定结果不一定与最终结果相符,特别是对于生长缓慢和生化反应模式相近的细菌种类,较易发生错误鉴定。本研究中,VITEK2 Compact 鉴定仪将 26 株实验菌株均鉴定为人苍白杆菌。此外,有文献报道将布鲁菌错误鉴定为人苍白杆菌的病例^[9]。布鲁菌和苍白杆菌同属布鲁菌科,其基因水平有很高的相似性,尽管苍白杆菌为条件致病菌,但也有突变成高致病力菌株的可能,所以当仪器法鉴定为苍白杆菌的时候,应当警惕仪器法鉴定出错的可能。

MALDI-TOF MS 是近年发展起来的一种新型软电离质谱技术,它主要检测经过处理后的细菌蛋白分

子通过仪器电离后,仪器真空管根据其质量及飞行时间分离离子,并以一系列的线或峰(质谱)显示结果,最后通过所得的质谱图与数据库中的微生物参考图谱比对后得出鉴定结果。目前,MALDI-TOF MS 技术已经广泛运用于临床微生物工作中来,比如新菌种的发现和鉴定,耐药基因的检测,甚至可以直接检测临床标本中的致病菌^[10]。本次实验使用 MALDI-TOF MS 的科研库才能鉴定出解糖精假苍白杆菌,而使用临床库是不能鉴定出这些少见菌的。MALDI-TOF MS 结果显示人苍白杆菌的质谱图在 m/z 5184 处可见其特有的显著峰图,而在解糖精假苍白杆菌的峰图中在 m/z 5051 处同样可观察到一个其特有的显著峰图,由此可见 MALDI-TOFMS 能有效地将两种细菌区分开来。鉴于 VITEK2 Compact 鉴定仪无法准确鉴定苍白杆菌,所以本次实验运用 MALDI-TOF MS 质谱检测该 26 株被误鉴定为人苍白杆菌的菌株,实际上 25 株为解糖精假苍白杆菌。*recA* 基因可以准确区分人苍白杆菌和布鲁菌,该批实验菌株均未扩增到 *recA* 基因,其原因可能是假苍白杆菌与布鲁菌的亲缘关系较远,与参考文献中针对布鲁菌 *recA* 基因设计的引物不匹配。最后通过基因测序证实为解糖精假苍白杆菌。由此可见,对于少见的苍白杆菌属细菌,可以运用 MALDI-TOF MS 质谱检测技术来快速鉴定。这为临床快速诊断由该类少见菌引起的感染,特别是血流感染提供了重要线索,也为下一步的抗感染治疗提供了思路和必要依据。

药敏结果显示该 25 株解糖精假苍白杆菌,哌拉西林/他唑巴坦、喹诺酮类、氨基糖苷类和复方新诺明的耐药率为 0.0%。而对氨曲南耐药率为 100.0%,对第三、四代头孢菌素、亚胺培南等其他 β -内酰胺类抗菌药物有不同的耐药率。其耐药可能的主要机制是细菌产生由染色体或质粒传播的头孢菌素酶 AmpC 酶。AmpC 酶能水解第三代头孢菌素和头霉素,头孢三代是产 AmpC 酶的诱导剂,不合理使用抗生素会迅速筛选出突变的耐药株^[11],从而导致耐药菌株扩散流行。但是在此次实验中,通过 PCR 法没有在解糖精假苍白杆菌中检测到 AmpC 和 AmpR 基因,证明解糖精假苍白杆菌对 β -内酰胺类抗菌药物的耐药机制不是通过产生头孢菌素酶来实现,这与人苍白杆菌的耐药机制不同^[12];可能与膜孔蛋白的缺失或者细菌细胞膜通透性的改变有关,而这需要通过进一步的实验来验证。因此,临床医生在选择治疗由解糖精假苍白杆菌引起感染的疾病的抗生素时,应当避免使用耐药率很高的氨曲南;而敏感率非常高的喹诺酮类、氨基糖苷类药

物,在儿童中又不推荐使用。所以临床医生应当根据当地流行病学调查数据及患者的具体情况来选择合适的抗生素,从本次实验的结果来看,选择除氨曲南以外的 β -内酰胺类抗菌药物来治疗由解糖精假苍白杆菌引起的感染是比较合适的。所以,对于这种少见的苍白杆菌如解糖精假苍白杆菌,有必要加强对它的快速鉴定能力,迅速为临床提供少见菌感染的诊断和治疗依据。

参考文献

- [1] 刘健龙,张洁,聂波丽,等. 91 例儿童人苍白杆菌败血症病原菌及耐药性分析[J]. 实用预防医学, 2010, 17(3): 447-448.
- [2] Velasco J, Romero C, López-Góñi I, et al. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp [J]. Int J Syst Bacteriol, 1998, 48Pt 3(4): 759-768.
- [3] 屈平华,赵红波,黄彬,等. 卫生部微生物室间质评 1012 菌的鉴定与放线菌属的系统发生分析[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(9): 814-819.
- [4] Kömpfer P, Rosselló-Mora R, Scholz HC, et al. Description of *Pseudochrobactrum* gen. nov., with the two species *Pseudochrobactrum asaccharolyticum* sp. nov. and *Pseudochrobactrum saccharolyticum* sp. nov. [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2006, 56(Pt 8): 1823-1829.
- [5] CLSI. Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing: approved guideline, CLSI document MM18-A [S]. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018: 16-17.
- [6] 陈海君,应华永,付跃娟. 21 例人苍白杆菌败血症患者的诊治分析[J]. 中华临床感染病杂志, 2008, 1(4): 238-238.
- [7] Ezzedine H, Mourad M, Van Ossel C, et al. An outbreak of *Ochrobactrum anthropi* bacteremia in five organ transplant patients [J]. J Hosp Infect, 1994, 27(1): 35-42.
- [8] Teyssier C, Marchandin H, Jean-Pierre H, et al. *Ochrobactrum pseudointermedium* sp. nov., a novel member of the family *Brucellaceae*, isolated from human clinical samples [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(Pt 5): 1007-1013.
- [9] 杨婧,任晓庆,褚美玲,等. 细菌自动鉴定仪 3 例布鲁氏菌误鉴定及文献复习 [J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(20): 2491-2494.
- [10] Murray PR. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology [J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(11): 1626-1630.
- [11] 宋文,孙倩楠,刘玉梅,等. 228 株铜绿假单胞菌 β -内酰胺酶的检测及耐药性分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(2): 165-169.
- [12] 李先斌,刘健龙,郭宽鹏,等. 儿童血流感染病原菌人苍白杆菌的流行种系及耐药特点 [J]. 实用预防医学, 2019, 26(5): 532-535.