

利用 MALDI-TOF MS 检测鲍曼不动杆菌对替加环素耐药性的研究

李蓉蓉¹, 方亚平², 李亚娟¹, 沈继录^{1,3}

摘要 目的 评价基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 技术对鲍曼不动杆菌的鉴定效果, 同源性分析能力及自建库效果。方法 利用 MALDI-TOF MS 技术鉴定 107 株鲍曼不动杆菌, 再进行药物敏感性分析, 筛选出替加环素耐药和敏感的鲍曼不动杆菌, 利用筛选出的鲍曼不动杆菌建立替加环素耐药和敏感鲍曼不动杆菌数据库, 最后进行自建库验证。结果 MALDI-TOF MS 将 107 株细菌鉴定为 103 株鲍曼不动杆菌、3 株琼氏不动杆菌和 1 株医院不动杆菌, 利用 K-B 法和微量肉汤稀释法检测 103 株鲍曼不动杆菌对替加环素敏感性, 得到 37 株替加环素耐药和 39 株替加环素敏感的鲍曼不动杆菌, 两种方法的一致率为 68.82% (64/93), 76 株鲍曼不动杆菌经同源性分析得到院内泛耐药鲍曼不动杆菌的分布, 最后, 自建库对替加环素耐药鲍曼不动杆菌的正确检出率为 87.4%, 替加环素敏感菌株的正确检出率为 77.5%。结论 MALDI-TOF MS 可快速鉴定鲍曼不动杆菌、琼氏不动杆菌及医院不动杆菌, 可对鲍曼不动杆菌进行同源性分析, 通过自建库可预测鲍曼不动杆菌对替加

环素的耐药性。

关键词 MALDI-TOF MS; 替加环素; 鲍曼不动杆菌; 同源性分析; 自建库

中图分类号 R 446.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)04-0540-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.04.011

致病菌的快速鉴定与药敏结果的获得能够指导临床抗生素的针对性用药, 从而提高病人的生存率^[1]。传统的检测方法主要是培养、生化实验、分子诊断等, 费用昂贵, 人力需求大^[2]。目前, 实验室新兴了一种对病原菌的检测方法: 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术 (matrix-assisted laser resolution ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)。该技术结果可靠, 鉴定快速, 成本低^[3]。基于此, 科研人员逐渐将目光放在对细菌耐药性的应用上^[4-6]。替加环素是 FDA 批准用于治疗感染性疾病的抗生素, 现已出现了部分替加环素耐药的鲍曼不动杆菌^[7], 其耐药机制复杂^[8], 目前, 对替加环素敏感性的检测主要通过 K-B 法及 MIC 法, 其耗时长, 因此, 该研究将通过利用 MALDI-TOF MS 技术建立快速检测替加环素耐药性的新方法。

2019-10-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金 (编号: 31600598)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230032

² 安徽医科大学第二附属医院检验科, 合肥 230601

³ 安徽医科大学第四附属医院检验科, 合肥 230011

作者简介: 李蓉蓉, 女, 硕士研究生;

沈继录, 男, 副教授, 主任技师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: shenjilu@126.com

cardiac color Doppler ultrasound. Plasma biochemical indicators were detected by automatic biochemical analyzer. Histopathological changes were observed by Masson, HE and TUNEL staining. Apoptosis index was detected by TUNEL staining. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect related protein expression. **Results** The results of cardiac color Doppler ultrasound showed that troxerutin significantly improved cardiac function. Masson, HE and TUNEL staining showed that compared with the model group, the cardiomyocytes in the low-dose group and the high-dose group were arranged neatly, the membrane was intact, the tissue fibrosis was reduced, and the collagen fibrosis was alleviated more effectively in the high-dose group ($P < 0.05$). TUNEL results showed that troxerutin significantly reduced myocardial apoptosis index ($P < 0.01$). Immunohistochemistry and Western blot showed that troxerutin could inhibit the expression of Collagen I and Caspase-3 ($P < 0.05$) and enhance the expression of p-AKT and p-XIAP ($P < 0.05$). **Conclusion** Triclopinone has a certain improvement effect on myocardial lesions in type 2 diabetic rats, and its mechanism may be related to activation of AKT/XIAP signaling pathway, inhibition of myocardial apoptosis and myocardial fibrosis.

Key words triclopinone; diabetes; myocardial disease; apoptosis; fibrosis

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 随机收集安徽医科大学第一附属医院 2016~2019 年间保存的 107 株鲍曼不动杆菌。

1.1.2 试剂与仪器 MALDI-TOF MS 质谱仪(德国 Bruker 公司); 无菌 96 孔板(上海生工有限公司); 替加环素(美国惠氏公司); 胰蛋白胨(英国 OXOID 公司); 酵母提取物(英国 OXOID 公司); NaCl(国药集团化学试剂北京有限公司); 麦康凯平板、哥伦比亚血平板、MH 平板(合肥天达有限公司); 替加环素纸片(英国 OXOID 公司); 超纯水 96 孔靶板(德国 Bruker 公司); MALDI-TOF MS 配套试剂包括 α -氰基-4-羟基肉桂酸(德国 Bruker 公司); 多肽标准品(德国 Bruker 公司); 无水乙醇(上海沃凯生物技术有限公司); 乙腈(天津市化学试剂供销公司); 甲酸(天津市化学试剂供销公司); 三氟乙酸(天津市化学试剂供销公司)均为分析纯。

1.1.3 软件 Bruker 质谱仪配套软件 MALDI Biotyper 3.0、FlexControl 3.0 及 WHONET 5.6。

1.2 方法

1.2.1 细菌复苏 将 107 株细菌从 -20°C 冰箱取出四区划线接种于麦康凯平板, 置于 35°C 恒温培养箱培养 18~24 h, 从麦康凯平板上挑取单个菌落接种于血平板上, 再置于 35°C 恒温培养箱培养 18~24 h。

1.2.2 MALDI-TOF MS 鉴定细菌 将血平板上培养 18~24 h 后长出的纯菌落用甲酸/乙腈法处理, 采用 MALDI-TOF MS 技术鉴定, 每株细菌点 3 个靶点, 每个靶点打 3 张图谱, 图谱由 FlexControl 3.0 软件手动获取。

1.2.3 药敏试验 先利用 K-B 法检测鲍曼不动杆

菌敏感性, 游标卡尺测量抑菌圈($\leq 12\text{ mm}$ 为耐药, $13\sim 15\text{ mm}$ 为中介, $\geq 16\text{ mm}$ 为敏感), 结果显示敏感的菌株视为对替加环素敏感, 对替加环素非敏感菌株再利用微量肉汤稀释法复查, 结果判读采用美国 FDA 推荐的折点判读标准($\text{MIC} \leq 2\text{ mg/l}$ 为敏感, 4 mg/l 是中介, $\geq 8\text{ mg/l}$ 为耐药)^[9], 采用替加环素耐药株及敏感株构建数据库。

1.2.4 自建库及算法分析 上述微量肉汤稀释法检测的敏感和耐药鲍曼不动杆菌的图谱导入 MALDI Biotyper 3.0, 去掉低质量图谱($\text{score} < 2.3$)。随机选出 20 株替加环素耐药鲍曼不动杆菌及 20 株替加环素敏感菌株导入 MALDI Biotyper 3.0 建立数据库, 余下鲍曼不动杆菌的图谱用于验证。

1.3 统计学处理 将替加环素耐药株和敏感株的图谱导入 MALDI Biotyper 3.0 利用 PCA 聚类分析进行同源性分析。利用 WHONET 5.6 软件统计不同型别细菌的药物敏感性。

2 结果

2.1 细菌鉴定及药敏结果 107 株细菌经 MALDI-TOF MS 鉴定结果为: 103 株鲍曼不动杆菌、3 株琼氏不动杆菌、1 株医院不动杆菌, 鉴定分数均 > 2.0 。103 株鲍曼不动杆菌利用 K-B 法检测对替加环素敏感性, 结果为敏感的有 10 株、耐药有 54 株、中介有 39 株。对 K-B 法结果为非敏感的 93 株鲍曼不动杆菌进行微量肉汤稀释法检测, 结果显示为敏感的有 29 株、耐药有 37 株、中介有 27 株, 两种方法的一致率为 68.82% (64/93), 替加环素敏感及耐药的鲍曼不动杆菌质谱图见图 1。利用 WHONET 5.6 对 37 株替加环素耐药的泛耐药鲍曼不动杆菌的科室分布进行统计分析, 其中干部呼吸内科 6 株、急诊 ICU 8 株、重症监护室 10 株、心外科 3 株、急诊外科、心内科、干部神经内科均 2 株、肝胆胰外科、呼吸内科、神

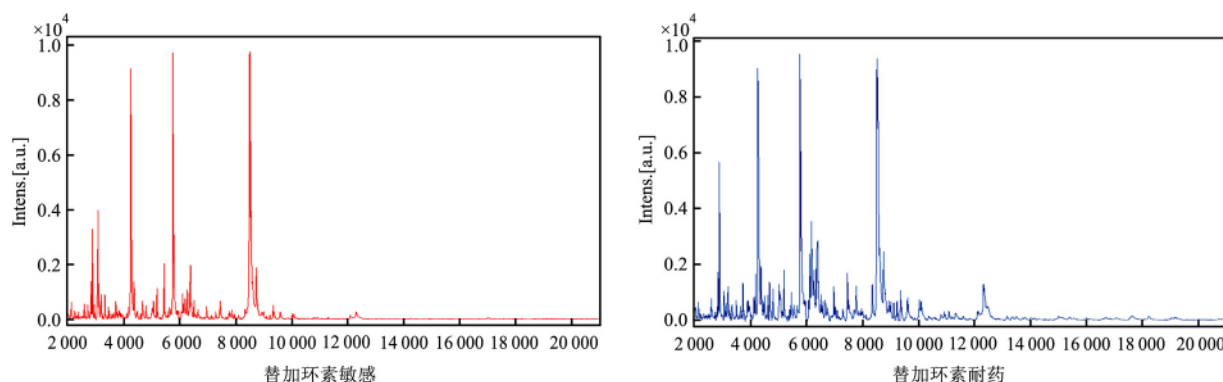


图1 替加环素敏感和替加环素耐药的鲍曼不动杆菌质谱图

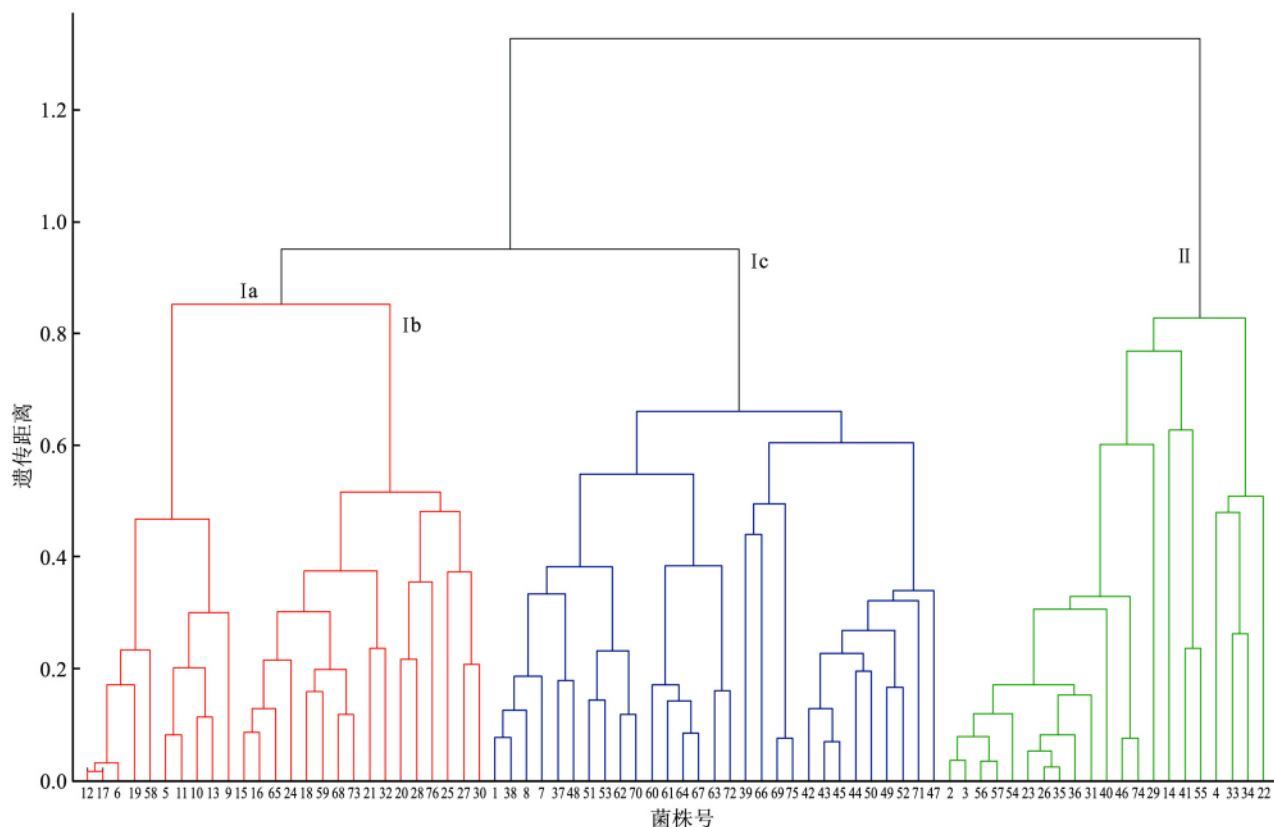


图2 76株鲍曼不动杆菌的同源性关系图

经外科、胸外科均1株。

2.2 同源性分析结果 将微量肉汤稀释法确定为替加环素敏感和耐药的76株鲍曼不动杆菌的图谱进行同源性分析,可将76株鲍曼不动杆菌明显分为2大簇4个分型(见图2)。分别命名为Ia、Ib、Ic、II。将泛耐药鲍曼不动杆菌定义为对包括替加环素及常规抗菌药物均耐药的鲍曼不动杆菌,这4种型别中对泛耐药鲍曼不动杆菌的比例分别为0%(0/10)、50%(8/16)、44.83%(13/29)、71.42%(15/21)。利用WHONET5.6软件统计出4种型别鲍曼不动杆菌对19种抗生素的耐药率,结果见表1,显示4种型别鲍曼不动杆菌对常规应用抗生素出现高耐药率,对米诺环素、替加环素和多黏菌素B的耐药率较低。对上述泛耐药鲍曼不动杆菌进行统计,结果显示急诊ICU、急诊外科、心外科、重症监护室均有I、II型泛耐药鲍曼不动杆菌,干部呼吸内科、干部神经内科出现Ib、Ic型,肝胆胰外科、神经外科仅有Ib型、呼吸内科仅有Ic型,心内科、胸外科仅有II型菌。

2.3 自建库结果 40株菌共得到280张(去掉80张低质量图谱)图谱建立替加环素敏感和耐药的鲍

曼不动杆菌数据库,利用自建库检测余下36株鲍曼不动杆菌的256张图谱(去掉77张低质量图谱),

表1 四种型别鲍曼不动杆菌对不同药物的药敏结果统计

药物	各型别耐药率(%)			
	Ia	Ib	Ic	II
氨苄青霉素	100.00	100.00	100.00	100.00
氨苄青霉素-舒巴坦	100.00	100.00	86.21	80.00
哌拉西林/他唑巴坦	100.00	100.00	100.00	100.00
头孢他啶	100.00	100.00	100.00	90.48
头孢曲松	100.00	100.00	96.67	90.48
头孢吡肟	100.00	100.00	96.67	100.00
亚胺培南	100.00	100.00	100.00	90.00
阿米卡星	100.00	92.35	100.00	80.00
庆大霉素	100.00	86.67	100.00	90.48
妥布霉素	100.00	84.62	100.00	90.48
环丙沙星	100.00	84.62	100.00	90.48
左氧氟沙星	100.00	100.00	76.67	85.00
复方新诺明	90.00	81.25	79.31	85.71
头孢噻肟	100.00	100.00	100.00	100.00
哌拉西林	-	100.00	100.00	85.71
美罗培南	-	91.67	100.00	86.67
米诺环素	-	62.50	36.36	55.56
替加环素	0.00	50.00	46.15	60.00
多黏菌素B	-	0.00	10.00	8.30

表格内“-”代表相应抗生素无统计结果

对替加环素耐药的鲍曼不动杆菌的正确检出率为 87.4%, 替加环素敏感菌株的正确检出率为 77.5%。

3 讨论

本实验中, 鲍曼不动杆菌对替加环素的耐药率为 35.92% (37/103)。出现这一高耐药性可能原因可能是收集菌株大部分多来源于急诊科同源性较强, 并且入院感染患者多属于重症感染患者, 耐药菌感染率高。替加环素属于高级抗生素, 出现对此药耐药后, 感染的治疗会变得困难, 并且多次抗生素诱导后敏感性细菌也可产生耐药性^[10]。因此, 临床感染的治疗需要合理应用抗生素, 降低耐药菌的产生。

本研究中, K-B 法和微量肉汤稀释法的一致率为 68.82%, 这种低一致率提示 K-B 法不能作为鲍曼不动杆菌对替加环素耐药性检测的标准。将微量肉汤稀释法结果作为参考, 自建库对替加环素敏感及耐药鲍曼不动杆菌的分类正确率分别为 77.5%、87.4%。研究发现^[11-12], 实验环境、预处理过程等均可影响图谱结果, 因此出现上述结果的可能原因包括以下几点: ① 数据库较小, 本课题组仅应用 20 株细菌建库; ② 培养环境、预处理过程等影响 MALDI-TOF MS 图谱; ③ 不同菌株用于验证的图谱数不等影响验证结果; ④ 鲍曼不动杆菌耐药机制复杂, 将所有耐药鲍曼不动杆菌归为一个库后检测效率低。因此, 对于一个新的数据库的建立, 可扩大实验菌株, 并控制所有菌株的实验条件, 以提高数据库的准确率。两个自建库的结果正确率分别为 77.5%、87.4%, 提示通过自建库预测鲍曼不动杆菌对替加环素的敏感性也可能成为细菌敏感性检测的新方法。

此外, 37 株替加环素耐药的泛耐药鲍曼不动杆菌的科室分布统计显示泛耐药鲍曼不动杆菌主要集中在急诊 ICU、干部呼吸内科及重症监护室 (64.9%), 其余则少量分布在急诊外科、心内科、干部神经内科、肝胆胰外科、呼吸内科、神经外科、胸外科。上述数据提醒这些科室目前需要严格的消毒灭菌, 控制院内感染的爆发。

利用 MALDI-TOF MS 进行同源性分析在之前文献也有出现^[13], 但结果不如 PFGE 法准确, 尚在探索研究阶段, 不作为流行病学统计分析的推荐方法。同源性分析结果显示, II 型泛耐药鲍曼不动杆

菌的检出比例最高, 占 71.42%, Ia 型未见泛耐药鲍曼不动杆菌, 所以同源性分析可用于初步筛选替加环素耐药的泛耐药不动杆菌。统计显示各型鲍曼不动杆菌对氨苄青霉素、氨苄青霉素-舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、头孢曲松、头孢吡肟、亚胺培南、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、环丙沙星、左氧氟沙星、复方新诺明、头孢噻肟、哌拉西林、美罗培南均显示高耐药率, 对米诺环素、替加环素、多黏菌素 B 的耐药率出现差别, Ia 型鲍曼不动杆菌对替加环素耐药率为 0%, 可用替加环素治疗 Ia 型鲍曼不动杆菌的感染, 神经外科仅有 Ib 型, 该型鲍曼不动杆菌对多黏菌素 B 的耐药率为 0%, 因此, 该型鲍曼不动杆菌感染后可用多黏菌素 B 治疗。而急诊 ICU、急诊外科、心外科、重症监护室均有 I、II 型耐替加环素鲍曼不动杆菌存在, 说明这几个科室可能存在交叉感染。

综上所述, MALDI-TOF MS 可快速鉴定鲍曼不动杆菌、琼氏不动杆菌、医院不动杆菌, 同源性分析可筛查泛耐药鲍曼不动杆菌, 自建库可预测鲍曼不动杆菌对替加环素的耐药性, 这为临床实验室检测细菌的药物敏感性提供了一种新的思路。

参考文献

- [1] Sakarikou C, Altieri A, Bossa M C, et al. Rapid and cost-effective identification and antimicrobial susceptibility testing in patients with Gram-negative bacteremia directly from blood-culture fluid [J]. *J Microbiol Methods*, 2018, 146: 7-12.
- [2] Hernández-Tolosa J E, Rincón-Serrano M de P, Celis-Bustos Y A, et al. Identification of mycobacteria to the species level by molecular methods in the Public Health Laboratory of Bogotá, Colombia [J]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016, 34(1): 17-22.
- [3] Frédéric Ric S, Antoine M, Bodson A, et al. Bacterial rapid identification with matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: development of an in-house method and comparison with Bruker Sepsityper® kit [J]. *Acta Clin Belg*, 2015, 70(5): 325-30.
- [4] Giordano C, Barnini S. Rapid detection of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* using MALDI-TOF MS peak-based assay [J]. *J Microbiol Methods* 2018, 155(12): 27-33.
- [5] Centonze A R, Bertonecelli A, Savio C, et al. Evaluation of rapid KPC carbapenemase detection method based on MALDI-TOF VITEK MS spectra analysis [J]. *J Med Microbiol* 2018, 67(10): 1474-79.
- [6] Chang K C, Chung C Y, Yeh C H, et al. Direct detection of carbapenemase-associated proteins of *Acinetobacter baumannii* using nanodiamonds coupled with matrix-assisted laser desorption/ioniza-

- tion time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Microbiol Methods*, 2018, 147: 36–42.
- [7] Pu L, Jian Z, Pan F, et al. Comparative genomic analysis and multi-drug resistance differences of in Chongqing, China [J]. *Infect Drug Resist* 2019, 12: 2827–38.
- [8] 王 健, 沈继录. 替加环素耐药机制的研究现状 [J]. *中国感染与化疗杂志* 2017, 17(2): 219–223.
- [9] 王 辉, 俞云松, 王明贵, 等. 替加环素体外药敏试验操作规程专家共识 [J]. *中华检验医学杂志*, 2013, 36(7): 584–87.
- [10] Han M L, Velkov T, Zhu Y, et al. Polymyxin-Induced Lipid A Deacylation in *Pseudomonas aeruginosa* Perturbs Polymyxin Penetration and Confers High-Level Resistance [J]. *ACS Chem Biol*, 2018, 13(1): 121–30.
- [11] Gogichaeva N V, Alterman M A. Amino Acid Analysis by Means of MALDI TOF Mass Spectrometry or MALDI TOF/TOF Tandem Mass Spectrometry [J]. *Methods Mol Biol* 2019, 2030: 17–31.
- [12] Torres I, Giménez E, Huntley D, et al. Comparison of two methods skipping cell lysis and protein extraction for identification of bacteria from blood cultures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rev Esp Quimioter*, 2019, 32(4): 365–9.
- [13] 余佳佳, 刘婧娴, 李媛睿, 等. 利用 MALDI-TOF MS 特异质量峰对耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌同源性的快速分型 [J]. *中国感染控制杂志* 2019, 18(3): 206–12.

Detection of tigecycline resistance of *Acinetobacter baumannii* by MALDI-TOF MS

Li Rongrong¹, Fang Yaping², Li Yajuan¹, et al

(¹Dept of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Laboratory Medicine, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Absrtact Objective To evaluate the identification effect, homology analysis ability and self-library effect of MALDI-TOF MS technology for *Acinetobacter baumannii*. **Methods** 107 strains of *Acinetobacter baumannii* were identified by MALDI-TOF MS technology, and then drug sensitivity analysis was carried out. Tigacycline-resistant and tigacycline-susceptible *Acinetobacter baumannii* were screened out. Databases of tigacycline-resistant and tigacycline-susceptible *Acinetobacter baumannii* were established using the screened *Acinetobacter baumannii*. Finally, self-built databases were verified. **Results** MALDI-TOF MS identified 107 strains of bacteria as 103 strains of *Acinetobacter baumannii*, 3 strains of *Acinetobacter junii* and 1 *Acinetobacter nosocomium*. K-B and broth dilution methods were used to detect the sensitivity of 103 strains of *Acinetobacter baumannii* to tegacycline. 37 strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to tegacycline and 39 strains of *Acinetobacter baumannii* susceptible to tegacycline were obtained. The consistency rate of the methods was 68.82% (64/93). Homology analysis for 76 strains of *Acinetobacter baumannii* revealed the distribution of pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in hospital. For self-built databases, the correct detection rate of tigacycline-resistant *Acinetobacter baumannii* and tigacycline-sensitive *Acinetobacter baumannii* was 87.4% and 77.5% respectively. **Conclusion** MALDI-TOF MS can quickly identify *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter junii* and *Acinetobacter nosocomium*, and it can carry out Homology analysis of *Acinetobacter baumannii*. The resistance of *Acinetobacter baumannii* to tegacycline can be predicted by self-built databases.

Key words MALDI-TOF MS; tegacycline; *acinetobacter baumannii*; homology analysis; self-built database