[文章编号] 1000-2200(2019)12-1587-04　　·基础医学·

对一组醋酸钙 – 鲍曼不动杆菌复合体细菌的基因型鉴定

王穆群，张　永

[摘要] **目的**：探讨鉴定醋酸钙 – 鲍曼不动杆菌复合体各菌种的有效方法。**方法**：运用全自动细菌鉴定系统联合分子生物学方法，经聚合酶链式反应(PCR)扩增鲍曼不动杆菌特异表达的 D 类碳青霉烯酶基因 *OXA*-51、16*S rRNA* 及醋酸钙 – 鲍曼不动杆菌复合体各菌种特异表达的 *gyrB* 基因，以准确鉴定醋酸钙 – 鲍曼不动杆菌复合体各菌种种属。**结果**：20 株醋酸钙 – 鲍曼不动杆菌复合体经全自动细菌鉴定及药敏分析系统鉴定均与原始种属相一致；经分子生物学方法鉴定结果为 *Acinetobacter baumannii* 16 株，*Acinetobacter calcoaceticus* 3 株，*Acinetobacter nosocomialis* 1 株。**结论**：全自动菌种鉴定系统辅以分子生物学基因分型方法可较为准确地鉴定醋酸钙 – 鲍曼不动杆菌复合体各个菌种。*gyrB* 基因作为到种鉴定标志物对于高度亲缘性菌种的鉴定价值更大。

[关键词] 醋酸钙 – 鲍曼不动杆菌复合体；基因分型鉴定；*OXA* – 51 基因，*gyrB* 基因；16*S rRNA* 基因

[中图法分类号] R 378.99　　[文献标志码] A　　**DOI**：10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.12.003

Study on genotyping in clinical *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex

WANG Mu-qun，ZHANG Yong

(*Department of Respiratory and Critical Care Medicine，The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College，Bengbu Anhui 233004，China*)

[**Abstract**] **Objective**：To investigate the effective methods for identification of all the genotypes of *Acinetobacter speciese*，including *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* (ACB) complex. **Methods**：For all ACB complex strains，bacterial identification was carried out using automatic bacteria identification system. Additionally，for more accurate discrimination between ACB complex species，Molecular Biology methods has been combined? with，all ACB complex strains were further subjected to polymerase chain reaction (PCR) amplification to detect the *A. baumannii*-specific expression of the class D carbapenemase gene *OXA*-51，16*S rRNA* gene and ACB complex *gyrB* genes，which specifically expressed in each species. **Results**：Totally all 20 ACB complex strains were identified as ACB complex by automatic bacteria identification system; which were identified by the method in Molecular Biology by PCR，of them 3 *A. calcoaceticus* strains and 1 *A. nosocomialis* strain were detected in ACB complex，together with 16 Acinetobacter baumannii strains. **Conclusions**：The combination of automatic bacteria identification system and Molecular Biology methods can provide more accurate genospecies identification in ACB complex. *gyrB* gene might be a more effective marker in the identification of highly phylogenetic related species.

[**Key words**] *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex；genotyping；*OXA*-51；*gyrB* gene；16*S rRNA* gene

不动杆菌属(*Acinetobacter spp.*)细菌广泛存在于自然界的条件致病菌[1]，目前已正式命名 62 个菌种(http://www.bacterio.net/acinetobacter.html)。依据细菌生化特征的商品化全自动菌种鉴定系统是临床上鉴定不动杆菌菌种的常用方法。通常醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、*Acinetobacter nosocomialis* 和 *Acinetobacter pittii* 通过鉴定技术很难区分，因而合称为醋酸钙 – 鲍曼不动杆菌复合体(ACB 复合体)。后来陆续有其他不动杆菌也被纳入其中，包括 *Acinetobacter seifertii*(曾称为近 13TU 型)、*Acinetobacter lactucae*(曾称为 NB14 型)以及不动杆菌基因型介于 1 ~ 3 之间的菌种等。因此，该复合物内菌种间遗传上密切相关、表型上难以区分[2]。

虽然 ACB 复合体各成员菌种表型相近，但流行病学特征却有很大不同。鲍曼不动杆菌是医院与社区获得性感染的最常见病原体之一；而 *A. pittii* 和 *A. nosocomialis*、*A. calcoaceticus* 等主要从土壤、水中分离出来，其是否导致临床感染仍不清楚；*A. seifertii*、*A. lactucae* 和不动杆菌基因型介于 1 ~ 3 之间的菌种也有从临床标本中分离出[3-5]。由于 ACB 复合体成员异质性明显，不同的临床意义也容易引

[收稿日期] 2019 – 08 – 12　[修回日期] 2019 – 09 – 18
[基金项目] 安徽省重点研究和开发计划项目(1804h08020287)；国家临床重点专科建设项目(2012-649)
[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 呼吸与危重症医学科，安徽 蚌埠 233004
[作者简介] 王穆群(1984 –)，女，硕士，住院医师.
[通信作者] 张　永，硕士研究生导师，博士，主任医师，副教授. E-mail：zsuzy@126.com

起临床误导,因此,准确鉴定 ACB 复合体各菌种具有科研和临床价值[6]。

除了以生化反应为基础的商品化鉴定系统,还有以下鉴定策略,如:仅存在于鲍曼不动杆菌的碳青霉烯酶基因 $bla_{OXA\text{-}51\text{-}like}$,用于对鲍曼不动杆菌的鉴定[7-8];16*S rRNA* 基因高度保守、普遍存在、高稳定性等特性,其序列具有的细菌属、种的特征,使得其一度在系统发育学研究中成为细菌鉴定和分类的"金标准"[9];*gyrB* 基因编码 DNA 回旋酶的 B 亚单位蛋白(GyrB),是惟一能诱导 DNA 负超螺旋的拓扑异构酶。因细菌 GyrB 具有种属特异性[10-11],*gyrB* 基因可作为 ACB 复合体的基因鉴定的基因序列[12-14]。本文拟采用以上不同菌种鉴定方法对 20 株 ACB 复合体进行菌种鉴定,以期确定最有效的菌种鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集蚌埠医学院第一附属医院自 2012 年 2 月至 2013 年 4 月自痰液、血液、手术及伤口分泌物、尿液等各种标本中无重复分离的 ACB 复合体 20 株。

1.2 质控菌株 金黄色葡萄球菌 ATCC29213、嗜麦芽窄食单胞菌 ATCC17666、大肠埃希菌 ATCC25933、鲍曼不动杆菌 ATCC19606,由我院微生物实验室提供。醋酸钙不动杆菌 ATCC23055,购于上海复祥生物科技有限公司。

1.3 仪器与试剂 VITEK 2 Compact 微生物鉴定/药敏系统、VITKE 比浊仪(法国生物梅里埃公司);梯度 PCR 仪(TGradient 型:Biometra 公司);GIS 凝胶成像分析系统(上海天能科技有限公司);SmartSpec™紫外分光光度计(Bio RAD);PCR 引物(见表 1)、DNA Marker、5×TBE(上海生工生物工程有限公司);PCR 扩增试剂盒(天根生化科技有限公司);琼脂糖、EB(加拿大 Ferments 公司)。

1.4 方法

1.4.1 法国梅里埃公司 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析系统 取 -80 ℃冻存菌株,以三分区法血平板接种,CO_2 培养箱培养 12~24 h。挑选单个菌落,0.45%无菌氯化钠溶液调配 1.0 麦氏管浊度(Mcfarland)菌液。以 VITEK 2 Compact 微生物鉴定/药敏系统进行菌种鉴定。

1.4.2 分子生物学方法鉴定 刮取新鲜菌落于 150 μL 无菌双蒸水,混匀后煮沸 10 min,于 4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,留取含有粗提取细菌总 DNA 的上清液,SmartSpec™紫外分光光度计检测并调节提取 DNA 的吸光度 A260/280 比值为 1.8~2.0。

表 1 引物合成序列表

目的基因	引物序列(5′-3′)	退火温度/℃	产物大小/bp	备注
OXA-51	F:TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG R:TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	53.0	353	[15]
菌种特异性 *gyrB* 基因 *				
A. pittii	D16:GAT AAC AGC TAT AAA GTT TCA GGT GGT D8:CAA AAA CGT ACA GTT GTA CCA CTG C	51.0	194	[16]
A. calcoaceticus	D14:GAC AAC AGT TAT AAG GTT TCA GGT G D19:CCG CTA TCT GTA TCC GCA GT	47.2	428	[16]
A. baumanni	Sp2F:GTT CCT GAT CCG AAA TTC TCG Sp4R:AAC GGA GCT TGT CAG GGT TA	54.0	490	[16]
A. baumannii 和 *A. nosocomialis*	Sp4F:CAC GCC GTA AGA GTG CAT TA Sp4R:AAC GGA GCT TGT CAG GGT TA	55.0	294	[16]
16*S rRNA*	F:AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG R:GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	54.9	1400	[12]

*注:菌种特异性 *gyrB* 基因:引物 Sp2F/Sp4R 扩增产物为 *A. baumannii* 所特有;引物 Sp4F/sp4R 扩增产物仅在 *A. baumannii* 及 *A. nosocomialis* 为阳性;引物 D14/D19 特异性扩增 *A. calcoacelicus* 的 *gyrB* 基因;引物 D16/D8 特异性扩增 GS 3 的 *gyrB* 基因。

PCR Master MIX(2×)12.5 μL、上游引物 1.0 μL,下游引物 1.0 μL,模板 DNA 1.0 μL,无核酸酶水 8.5 μL 构成反应体系,94 ℃预变性 3 min、94 ℃变性 30 s、退火 30 s(*OXA*-51 53 ℃、GS3 *gyrB* 51 ℃、*A. calcoaceticus gyrB* 47.2 ℃,*A. baumanni gyrB* 54 ℃,*A. baumannii* 和 GS13TU *gyrB* 55 ℃、16*S rRNA* 54.9 ℃)、72 ℃延伸 1 min,共 30 个循环,最后 72 ℃延伸 5 min。

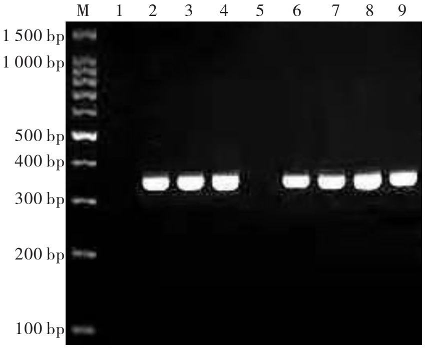
PCR 产物以 1%琼脂糖凝胶电泳,GIS 凝胶成像系统读取结果,拍摄并记录结果。PCR 扩增的 16*S*

rDNA 产物经琼脂糖凝胶电泳初步检测后，由上海生工生物工程技术公司进行纯化和序列测定。所得片段序列运用在线序列比对 BLASTn 与 GenBank 上的基因序列进行比对分析。

2 结果

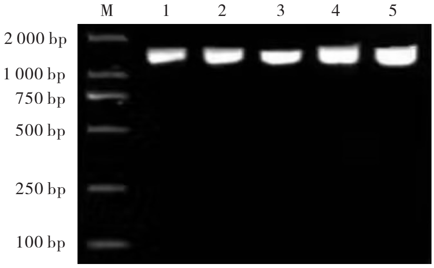
OXA-51 为 Ab 的标志基因，以 Ab 标准株做参照，在 20 株 ACB 复合体中，16 株阳性表达(即 16 株 Ab)，其余种属未能确定。其检测结果见图 1。20 株 ACB 复合体经 16S rRNA 扩增，获得特异性条带(见图 2)。扩增产物经测序，在 NCBI 数据库中对测序结果进行 BLAST 比对分析，其结果为 Ab 16 株，A. calcoacelicus 3 株，及 1 株不明确基因型不动杆菌。20 株 ACB 复合体中 PCR 扩增 Sp4F/Sp4R 阳性率为 85%，Sp2F/Sp4R 阳性率为 80%，即 16 株为 Abs；1 株为 GS 13TU(16*S rRNA* 基因分析未确定基因型的菌株)(见图 3 ~ 5)；3 株表达 D14/D19，即为 *A. calcoacelicus*(见图 6)。D16/D8 未检测出阳性菌株。

Sp2F/Sp4R、Sp4F/Sp4R 均以鲍曼不动杆菌标准株做参照；D14/D19 以醋酸钙不动杆菌标准株做参照。



M为Marker；2为*A.baumannii*标准株，3、4、6、7、8、9为OXA-51基因扩增阳性菌株，1、5为阴性扩增；目的基因片段353 bp

图1 OXA-51扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

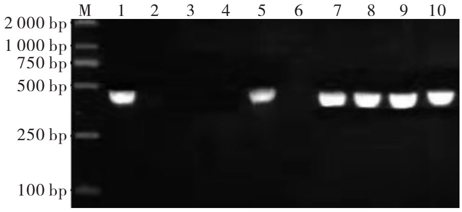


M为Marker，目的基因片段1 400 bp

图2 16S rRNA扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

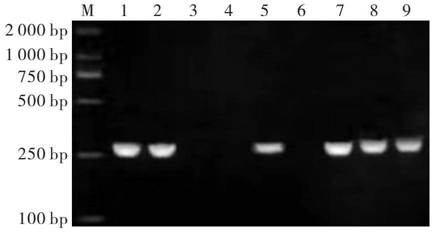
3 讨论

不动杆菌属革兰染色阴性、非发酵、专性需氧、



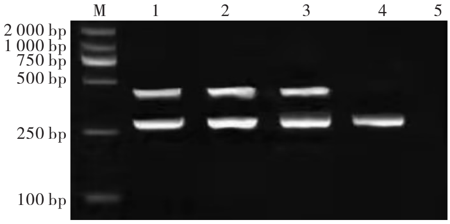
M为Marker，1为*A.baumannii*标准株，5、7、8、9、10为Sp2F/Sp4R基因扩增阳性菌株，2、3、4、6为阴性扩增；目的基因片段490 bp

图3 *A.baumannii gyrB*基因扩增产物琼脂糖凝胶电泳



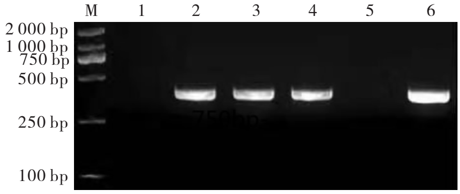
M为Marker，1为*A.baumannii*标准株，2、5、7、8、9为Sp4F/Sp4R基因扩增阳性菌株，3、4、6为阴性扩增；目的基因片段294 bp

图4 *A.nosocomialis gyrB*基因扩增产物琼脂糖凝胶电泳图



M为Marker，1为*A.baumannii*标准株，2、3为Sp2F/Sp4R、Sp4F/Sp4R基因扩增均阳性菌株，4为Sp2F/Sp4R基因扩增阴性、Sp4F/Sp4R基因扩增阳性菌株

图5 *A.baumannii*、*A.nosocomialis gyrB* 基因扩增产物琼脂糖凝胶电泳图



M为Marker，6为*A.calcoacelicus*标准株，2、3、4为D14F/D19基因扩增阳性菌株，1、5为阴性扩增；目的基因片段428 bp

图6 *A.calcoacelicus gyrB*基因扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

无动力、氧化酶阴性球杆菌的生化特性，全自动化分析仪器很容易鉴定到属。在菌株为 *A. baumannii* 时，根据表型差别鉴定菌种的自动化系统具有一定优势，但是 *A. nosocomialis*、*A. pittii* 和 *A. calcoacelicus* 的生化特性与 *A. baumannii* 很相似，当菌株为三者中的任意一种时全自动化分析仪器只能将其鉴定为 ACB 复合体[17]。*A. baumannii* 在医院内爆发是世界范围的的一个主要问题[18]，ACB 复合体的其他菌种很少涉及流行，因此对其研究较少[11]；而散发的 ACB 复合体并不被认为是一个严重的公共卫生问

题,因此对它们的了解较少[19]。

$bla_{OXA\text{-}51}$作为鉴定 *A. baumannii* 的的基因标志物,本研究 20 株 ACB 复合体中,检测结果示 16 株阳性表达 *OXA*-51,阳性率为 80%。即初步判断 20 株 ACB 中 16 株为 *A. baumannii*。但是 *OXA*-51 仅存在于 *A. baumannii* 中,只可作为鉴定 *A. baumannii* 的标志物,无法鉴定其他菌种。

本研究 20 株 ACB 复合体中 *A. baumannii* 16 株,*A. calcoacelicus* 3 株,及 1 株不明确基因型的不动杆菌。16*S rRNA* 基因序列曾作为细菌鉴定和分类"金标准",但是由于 16*S rRNA* 基因缺乏足够的多态性,其无法用以鉴定所有的不动杆菌[13],本实验支持此观点。

以上研究结果显示,全自动细菌鉴定及药敏分析系统在菌种鉴定方面虽然存在便捷、快速、鉴定范围广等优点,但在菌种鉴定准确度方面仍存在明显的缺陷,对于表型相似的菌种(如 ACB 复合体的各菌种)无法达到准确鉴定的效果,需辅以分子生物学基因分型方法。*OXA*-51 在对 *A. baumannii* 的鉴定上准确度达 100%,并未发现其他基因型不动杆菌表达 *OXA*-51;近年不断有研究示 gyrB 基因在亲缘关系较近的细菌的鉴定上优于 16*S rRNA* 基因,本次试验结果与上述结论相一致,并且由于 *gyrB* 基因分析方法简便、可靠性高,可用于微生物实验室作为 ACB 复合体各菌种快速鉴定的方法。

目前鉴定技术发展如质谱、NGS 等,虽然代表了鉴定技术的方向,但存在设备要求高、费用昂贵、需要更多探索和完善,本文涉及的相对传统的鉴定方法技术成熟,容易实施,临床关联性好。ACB 复合体异质性高,其流行病学及临床致病性特点,从科研及临床角度需要更清晰鉴别。本研究中组合其中 1-2 种鉴定方法可以实现准确鉴定。gyrB 基因在高度亲缘菌种鉴定中优于其他鉴定方法。

[参 考 文 献]

[1] ZARRILLI R, POURNARAS S, GIANNOULI M, *et al*. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages[J]. Int J Antimicrob Agents, 2013, 41(1): 11.

[2] VILLALÓN P, ORTEGA M, SÁEZ-NIETO JA, *et al*. Dynamics of a sporadic nosocomial *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex population[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 593.

[3] PELEG AY, SEIFERT H, PATERSON DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen[J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21(3): 538.

[4] NEMEC A, KRIZOVA L, MAIXNEROVA M, *et al*. *Acinetobacter seifertii sp*. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2015, 65(Pt 3): 934.

[5] COSGAYA C, MARÁ-ALMIRALL M, VAN ASSCHE A, *et al*. *Acinetobacter dijkshoorniae sp*. nov., a 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.

[6] LIN MF, LAN CY. *Antimicrobial resistance in Acinetobacter baumannii*: from bench to bedside[J]. World J Clin Cases, 2014, 2(12): 787.

[7] GÓMEZ RF, CASTILLO A, CHÁVEZ-VIVAS M. Characterization of multidrug-resistant *Acinetobacter ssp. strains isolated* from medical intensive care units in Cali-Colombia[J]. Colomb Med (Cali), 2017, 48(4): 183.

[8] 邹自英,陈莉,刘媛,等. 分子生物学方法鉴定鲍曼不动杆菌与仪器鉴定结果比较[J]. 四川医学, 2014, 35(9): 1123.

[9] KITAHARA K, MIYAZAKI K. Revisiting bacterial phylogeny: Natural and experimental evidence for horizontal gene transfer of 16S rRNA[J]. Mob Genet Elements, 2013, 3(1): e24210.

[10] HIGGINS PG, WISPLINGHOFF H, KRUT O, *et al*. A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii and Acinetobacter genomic* species 13TU[J]. Clin Microbiol Infect, 2007, 13(12): 1199.

[11] SCHLEICHER X, HIGGINS PG, WISPLINGHOFF H, *et al*. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii and Acinetobacter nosocomialis* in Germany over a 5-year period (2005-2009)[J]. Clin Microbiol Infect, 2013, 19(8): 737.

[12] LEE MJ, JANG SJ, LI XM, *et al*. Comparison of *rpoB* gene sequencing, 16*S rRNA* gene sequencing, *gyrB* multiplex PCR, and the VITEK2 system for identification of *Acinetobacter* clinical isolates[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2014, 78(1): 29.

[13] WANG J, RUAN Z, FENG Y, *et al*. Species distribution of clinical Acinetobacter isolates revealed by different identification techniques[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104882.

[14] 黄育波,张天托,朱家馨,*et al*. 医院获得性肺炎患者醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合体的鉴定和耐药基因研究[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(3): 476-481.

[15] TURTON JF, WOODFORD N, GLOVER J, *et al*. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(8): 2974.

[16] HIGGINS PG, LEHMANN M, WISPLINGHOFF H, *et al*. *gyrB* multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus and Acinetobacter genomic* species 3[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(12): 4592.

[17] LIM YM, SHIN KS, KIM J, *et al*. Distinct antimicrobial resistance patterns and antimicrobial resistance-harboring genes according to genomic species of *Acinetobacter* isolates[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(3): 902.

[18] AL ATROUNI A, JOLY-GUILLOU ML, HAMZE M, *et al*. Reservoirs of Non-*baumannii Acinetobacter* Species[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 49.

[19] SONNEVEND A, GHAZAWI A, AL MUNTHARI N, *et al*. Characteristics of epidemic and sporadic strains of *Acinetobacter baumannii* isolated in Abu Dhabi hospitals[J]. J Med Microbiol, 2013, 62(Pt 4): 582.

(本文编辑 刘梦楠)