

论著·临床研究

MALDI-TOF MS 用于耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌同源性分析的研究*

徐建民,蒋虔,杨哲,李好莲,姜铮,宋世平,袁顺宗,尹秀云,陈建魁[△]
(解放军总医院第五医学中心/原解放军第 307 医院检验科,北京 100071)

摘要:目的 探索基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)对耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)进行同源性分析在临床实验室应用的可行性。方法 以多位点序列分型(MLST)方法对 95 株 CRKP 分型结果为标准,采用 MALDI-TOF MS 技术对上述 95 株 CRKP 分析后的聚类分析结果进行一致性比较,观察 MicroflexTM 质谱仪对 CRKP 的分型能力。结果 MicroflexTM 质谱仪聚类分析结果显示 95 株菌分为 2 大类,5 个亚类。其中 I b 和 I c 亲缘关系较近, I a 与 I b、I c 较远;与 MLST 结果相比较, ST1、ST15 分布在 I b 亚类中; ST1198、ST152、ST1030、ST1254 分布在 II a 亚类中; ST2260、ST2928 分布在 II b 亚类中,其余 87 株 ST11 型分布在各亚类中。结论 MALDI-TOF MS 聚类分析结果与 MLST 结果并不一致, MALDI-TOF MS 应用于同源性分析还需更详细的研究。

关键词:基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 多位点序列分型; 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌; 同源性分析;

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.21.006

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2019)21-2580-04

文献标识码:A

Experimental study on homology analysis of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* by MALDI-TOF MS*

XU Jianmin, JIANG Qian, YANG Zhe, LI Haolian, JIANG Zheng, SONG Shiping,
YUAN Shunzong, YIN Xiuyun, CHEN Jiankui[△]

(Department of Clinical Laboratory, the Fifth Medical Center, Chinese PLA
General Hospital / Former 307th hospital of PLA, Beijing 100071, China)

Abstract: Objective To explore the feasibility of homology analysis of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*(CRKP) by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry(MALDI-TOF MS) in clinical laboratory. **Methods** The results of clustering analysis of 95 CRKP strains were compared by using MALDI-TOF MS technology based on multi-site sequence typing(MLST) method. The ability of microflexTM mass spectrometer to classify CRKP strains was observed. **Results** MicroflexTM mass spectrometer cluster analysis showed that 95 strains of bacteria were divided into two groups, five subgroups. The relationship between I b and I c was close, I a was far from I b and I c. Compared with MLST results, ST1 and ST15 were distributed in I b subclass, ST1198, ST152, ST1030 and ST1254 were distributed in I a subclass, ST2260 and ST2928 were distributed in I b subclass, and the rest 87 strains of ST11 were distributed in each subclass. **Conclusion** The results of MALDI-TOF MS cluster analysis are not consistent with those of MLST. The application of MALDI-TOF MS in homology analysis needs more detailed study.

Key words: matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; multi-site sequence typing; carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*; homology analysis

越来越多碳青霉烯类抗菌药物耐药菌株的出现使临床针对感染治疗的形势愈发严峻^[1]。碳青霉烯

类抗菌药物耐药机制与细菌的生物被膜形成,外膜孔蛋白丢失合并 β 内酰胺酶的过度表达,或菌株表达碳

* 基金项目:国家科技重大专项资助项目(2018ZX10713003-001-016)。

作者简介:徐建民,男,主管技师,主要从事微生物和免疫学诊断方面的研究。 △ 通信作者,E-mail:chenjk307@163.com。

本文引用格式:徐建民,蒋虔,杨哲,等. MALDI-TOF MS 用于耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌同源性分析能力的实验研究[J]. 国际检验医学杂志,2019,40(21):2580-2583.

青霉烯酶相关^[2-6]。产碳青霉烯酶是肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的重要机制^[7]。该酶的编码基因主要位于转座子、整合子、质粒等可移动的基因单元上,从而导致耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)可以通过垂直或水平方式快速出现及传播^[6]。临幊上治疗 CRKP 感染的手段极其有限,一般只能采取患者隔离或对住院环境采取消毒等措施^[8]。因此,快速准确的对 CRKP 进行同源性分析,及时有效的溯源对控制院内感染尤为重要。

多位点序列分型(MLST)是通过聚合酶链式反应(PCR)扩增管家基因片段并进行序列分型,根据其序列型(ST)结果进行同源性分析。可通过网络实现室间数据共享及比对,数据分析简便快捷、可比性强、能直接对临幊标本进行分析^[9]。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术用于微生物快速鉴定是近年来的研究热点,它是利用 MALDI-Biotyper 3 软件构建发育树对其进行同源性分析,具有快速、准确、重复性好的特点,在国内临幊微生物实验室已得到较好地应用^[10]。

笔者以 MLST 分型方法获得的同源性结果为标准^[11],对 MALDI-TOF MS 获得的同源性分析结果进行评价,探索 MALDI-TOF MS 对耐药肺炎克雷伯菌

同源性分析在临幊实验室应用的准确性和可行性。

1 材料与方法

1.1 CRKP 菌株 菌株的来源分布、MLST 分型引物序列、扩增条件及扩增产物结果处理方法,参照笔者前文^[9]。

1.2 方法 将 95 株 CRKP 接种于哥伦比亚血平皿上,放入温度为 35 °C、CO₂ 浓度为 5% 的培养箱中培养 24 h。用灭菌竹签挑取单个菌落,少量菌体均匀涂布在靶板孔位上,室温下晾干。加 1 μL 70% 甲酸溶液均匀涂覆在样本上,室温下晾干。再加 1 μL IVD HCCA 基质溶液均匀覆盖在待测样本上,室温下晾干。将加样完成的待测靶板放入 Microflex™ 质谱仪,进行上机检测。利用 Microflex™ 质谱仪配套软件 MALDI Biotyper RTC 进行蛋白质指纹峰图谱的采集。结果评价分数判断标准:2.0 分以下为匹配一般,2.0~<2.3 分为匹配较好,2.3~3.0 分为匹配好;并将蛋白质指纹峰图导入 MALDI-Biotyper 3 软件进行聚类分析。

2 结 果

2.1 指纹图谱获得 95 株 CRKP 鉴定得分均超过 2.3,结果为匹配好,表明获得的蛋白指纹图谱较完整,可以进行聚类分析,见表 1。

表 1 95 株 CRKP MALDI-TOF MS 鉴定得分详表

上机 编号	样本 编号	鉴定 得分												
1	Q1	2.431	20	Q20	2.465	39	Z19	2.355	58	I 7	2.641	77	N9	2.317
2	Q2	2.365	21	Z1	2.325	40	Z20	2.374	59	I 8	2.415	78	N10	2.331
3	Q3	2.442	22	Z2	2.459	41	Z21	2.416	60	I 9	2.427	79	N11	2.457
4	Q4	2.376	23	Z3	2.371	42	Z22	2.435	61	I 10	2.319	80	N12	2.510
5	Q5	2.452	24	Z4	2.448	43	Z23	2.516	62	I 11	2.324	81	N13	2.412
6	Q6	2.471	25	Z5	2.398	44	Z24	2.378	63	I 12	2.510	82	N14	2.427
7	Q7	2.398	26	Z6	2.336	45	Z25	2.362	64	I 13	2.601	83	N15	2.481
8	Q8	2.333	27	Z7	2.374	46	Z26	2.394	65	I 14	2.410	84	N16	2.378
9	Q9	2.471	28	Z8	2.417	47	Z27	2.342	66	I 15	2.472	85	N17	2.507
10	Q10	2.354	29	Z9	2.446	48	Z28	2.330	67	I 16	2.383	86	N18	2.313
11	Q11	2.336	30	Z10	2.357	49	Z29	2.347	68	I 17	2.349	87	N19	2.577
12	Q12	2.421	31	Z11	2.517	50	Z30	2.415	69	N1	2.327	88	N20	2.461
13	Q13	2.501	32	Z12	2.481	51	Z31	2.428	70	N2	2.347	89	N21	2.378
14	Q14	2.444	33	Z13	2.612	52	I 1	2.518	71	N3	2.318	90	N22	2.369
15	Q15	2.378	34	Z14	2.541	53	I 2	2.425	72	N4	2.389	91	N23	2.415
16	Q16	2.391	35	Z15	2.539	54	I 3	2.448	73	N5	2.603	92	N24	2.422
17	Q17	2.610	36	Z16	2.473	55	I 4	2.416	74	N6	2.321	93	N25	2.381
18	Q18	2.542	37	Z17	2.469	56	I 5	2.431	75	N7	2.365	94	N26	2.571
19	Q19	2.376	38	Z18	2.379	57	I 6	2.361	76	N8	2.416	95	N27	2.410

2.2 质谱聚类分析结果 首先通过 MicroflexTM 质谱仪的分析软件 Flexanalysis 获得蛋白质指纹峰信息,再将蛋白质指纹峰谱图导入 MALDI-Biotyper 3 软件进行聚类分析。从聚类分析图中可发现:95 株菌可分为 I、II 2 个大类,I a、I b、I c、II a、II b 五个亚类,95 株 CRKP 聚类分析树状图中,可以直观的发现 I 类中 I b 和 I c 亚类亲缘关系较近,I a 亚类与 I b、I c 亚类亲缘关系较远;II 类中 II a 和 II b 亚类亲缘关系较近。见图 1。

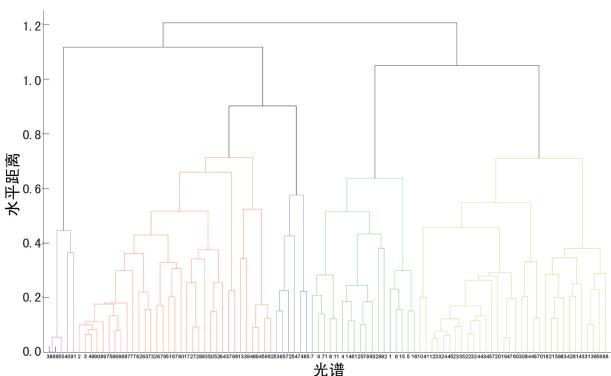


图 1 95 株 CRKP 蛋白峰聚类分析图

表 2 MLST、MALDI-TOF MS 结果与来源科室分布

样本号	MLST	MALDI-TOF MS	来源科室
Q2	ST 1	Ib	移植科
Q4	ST 1198	IIa	移植科
Q5	ST 152	IIa	移植科
Q9	ST 1030	IIa	呼吸科
Q10	ST 2260	IIb	乳腺肿瘤科
Q11	ST 1254	IIa	消化科
Q18	ST 2928	IIb	血液科
Z24	ST 15	Ib	重症医学科
其余	ST 11	各亚类均有分布	重症医学科;ICU 病区;内科监护病房;其他病房。

注:其余为 Q1、Q3、Q6~8、Q12~17、Q19~20、Z1~23、Z25~31、N1~30、I1~17

2.3 质谱聚类分析与 MLST 分型结果的比较 笔者之前的研究中^[9],MLST 分型结果显示:Q2 号菌株为 ST1 型,Z24 号菌株序列为 ST15 型,Q4 为 ST1198 型,Q5 为 ST152 型,Q9 为 ST1030 型,Q10 为 ST2260 型,Q11 为 ST1254 型,Q18 为 ST2928 型,另外 87 株 CRKP 的 MLST 分型均为 ST11 型。利用在线分析软件 eBURST V3 对上述 MLST 结果进行分析,结果最终显示 ST2260 和 ST11 为同一克隆型,ST1、ST15、ST152、ST1030、ST1198、ST1254、ST2928 为单个型。证明其中 88 株菌株亲缘关系近,另外 7 株菌亲缘关系较远。本研究中,MALDI-TOF MS 聚类分析结果却将 95 株 CRKP 分为了 2 大类,5 个亚类。与 MLST

结果相比较后,发现 87 株 ST11 型分布在各亚类中,Q4、Q5、Q9、Q11 分布在 II a;亚类中 Q10、Q18 分布在 II b 亚类中;Q2、Z24 分布在 I b 亚类中。见表 2。

3 讨 论

MALDI-TOF MS 鉴定基于细菌表达的蛋白质峰的特征及丰度,通过分析待测菌体蛋白质峰图与模式菌蛋白质峰图之间的相似处,进而得到鉴定结果^[12]。蛋白质由遗传基因物质决定,相对分子质量较大,性质相对稳定,MALDI-TOF MS 通过分析同菌种间的细微差异,可以对细菌进行进一步分型^[13]。其实验特点是简单、快速,可在几分钟内通过 MALDI-Biotyper 3 获得聚类分析及主成分图。近来有国内学者研究证明^[14-17],MALDI-TOF MS 聚类分析可以对常见致病菌及耐药菌进行同源性分析。

国内学者谢思^[18]对 53 株 CRKP 进行 MLST 和 MALDI-TOF MS 同源性分析发现,两种方法结果相近,学者认为 MALDI-TOF MS 的结果比 MLST 结果能更详细的展示各菌株之间的亲缘关系。MENCACCI 等^[19]采用 MALDI-TOF MS 对 35 株泛耐药鲍曼不动杆菌进行同源性分析,结果与重复序列 PCR 的分型结果基本相符,学者认为在未获得基因分型结果前,MALDI-TOF MS 可以用来对耐药菌暴发感染的提前判断。

笔者之前的研究中^[11],MLST 分型结果显示:Q10 为 ST2260 型,Q2 号菌株为 ST1 型,Z24 号菌株序列为 ST15 型,Q5 为 ST152 型,Q4 为 ST1198 型,Q9 为 ST1030 型,Q11 为 ST1254 型,Q18 为 ST2928 型,其余 87 株 CRKP 的 MLST 分型均为 ST11 型。eBURST V3 对以上 MLST 结果进行进一步分析,最终结果显示 ST2260 和 ST11 为同一克隆型,ST1、ST15、ST152、ST1030、ST1198、ST1254、ST2928,7 株为单个型。结果显示 1 株 ST2260 和 87 株 ST11,共 88 株菌株亲缘关系近,另外 7 株菌亲缘关系较远。而 MALDI-TOF MS 聚类分析结果却将 95 株 CRKP 分为了两大类,5 个亚类,两种方法结果相比较发现,Q2、Z24 分布在 I b 组中;Q4、Q5、Q9、Q11 分布在 II a 组中;Q10、Q18 分布在 II b 组中,其余 87 株 ST11 型各亚类中均有分布。

研究结果显示,MicroflexTM 质谱仪聚类分析结果与 MLST 分型结果并不完全一致,原因分析:MLST 的分型原理是从基因分子层面对细菌进行分析,虽然该方法检测了 7 对管家基因,但对于分析含有大量基因组序列插入或缺少某些基因组序列详细信息的菌株存在一定的局限性;MALDI-TOF MS 聚类分析原理基于蛋白质的表达及其表达丰度,然而临床分离自 CRKP 受到抗菌药物选择压力、感染位置、

分离培养环境等因素的影响,其某些菌体蛋白可能过表达或不表达。使其蛋白峰图产生差别,从而导致进一步聚类分析时产生误差。与国内外部分学者的研究结果相比较,笔者实验结果与前者部分研究结果并不完全相符。可能与研究中的标本量比前者的实验标本数量更多,来源科室更多有关系。如此一来,MALDI-TOF 在 CRKP 同源性分析方面的应用还需要更深入的研究。SACHSE 等^[20]研究对比了 MALDI-TOF、MLST 及随机引物扩增 DNA 多态性分析三种同源性分析方法,结果显示,三种方法之间结果并不完全一致。该学者认为,MALDI-TOF MS 应用于临床需要更多、更进一步的研究证实。

4 结 论

从本实验结果上看,虽然 MALDI-TOF MS 聚类分析能够将 95 株 CRKP 亲缘关系显示的比较直观清晰,但是该方法广泛应用于临床菌株同源性分析还需要更深入的实验研究。

参考文献

- [1] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2017 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2018,03:241-251.
- [2] WOZNIAK A, VILLAGRA N A, UNDABARRENA A, et al. Porin alterations present in non-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile[J]. J Med Microbiol, 2012, 61(9):1270-1279.
- [3] CEPAS V, LÓPEZ Y, MUÑOZ E, et al. Relationship between biofilm formation and antimicrobial resistance in gram-negative bacteria[J]. Microb Drug Resist, 2018, 25 (1):72-79.
- [4] PEREZ F, DUIN D. Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: a menace to our most vulnerable patients[J]. Cleve Clin J Med, 2013, 80(4):225-233.
- [5] FERRANTI M, SCHIAROLI E, PALMIERI M, et al. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae isolates resistant to last-line antibiotics in an Italian general hospital[J]. New Microbiol, 2018, 41(4):274-281.
- [6] CHEN L, MATHEMA B, CHAVDA K D, et al. Carbapenemase-producing klebsiella pneumoniae: molecular and genetic decoding [J]. Trends Microbiol, 2014, 22 (12): 686-696.
- [7] NORDMANN P, NAAS T, POIREL L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae [J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(10):1791-1798.
- [8] GUDUCUOGLU H, GURSOY N C, YAKUPOGLU ULLARI Y, et al. Hospital outbreak of a colistin-resistant, NDM-1 and OXA-48-producing klebsiella pneumoniae: high mortality from pandrug resistance[J]. Microb Drug Resist, 2018, 24(7):966-972.
- [9] 王中强,邱少富,王勇,等.多位点序列分型技术及其研究进展[J].军事医学科学院院刊,2010,34(1):76-79.
- [10] 彭海,周健武,牟晓明,等. MALDI-TOF MS 技术在多重耐药大肠埃希菌同源性分析及自建库中的应用研究[J]. 中华医院感染学杂志,2018,28(24):3689-3694.
- [11] 徐建民,梁钰英,蒋虔,等.利用多位点序列分型方法对 CRKP 分型的初步研究[J].标记免疫分析与临床,2018, 25(10):85-92.
- [12] DOERN C D. Integration of technology into clinical practice[J]. Clin Lab Med, 2013, 33(3):705-729.
- [13] WELKER M. Proteomics for routine identification of microorganisms[J]. Proteomics, 2011, 11(15):3143-3153.
- [14] 王亚南,高晶晶,钟桥,等. MALDI-TOF MS 技术在鲍曼不动杆菌鉴定及同源性分析中的应用[J]. 临床检验杂志,2015,33(6):430-433.
- [15] 屠博文,史伟峰,韩晓冬,等. MALDI-TOF 质谱在院内感染致病菌检测中的应用[J]. 重庆医学,2015,44(33): 4665-4670.
- [16] 程招敏,蓝锴,柏彩英,等. 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱在鼠伤寒沙门菌同源性分析中的应用价值[J]. 蚌埠医学院学报,2016,41(4):426-430.
- [17] 鲍金如,沈萍,应超群,等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合菌鉴定及同源性分析中的应用[J]. 中国抗生素杂志,2017,42(2):134-138.
- [18] 谢思. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药性及同源性研究[D]. 广州:南方医科大学,2017.
- [19] MENCACCI A, MONARI C, LELI C, et al. Typing of nosocomial outbreaks of acinetobacter baumannii by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight Mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51 (2):603-606.
- [20] SACHSE S, BREASAN S, ERHARD M, et al. Comparison of multilocus sequence typing, RAPD, and MALDI-TOF mass spectrometry for typing of β -lactam-resistant Klebsiella pneumoniae strains. [J] Diagn Microbiol Infect Dis, 2014, 80(4):267-271.

(收稿日期:2019-02-18 修回日期:2019-05-02)