

• 短篇论著 •

MALDI-TOF MS 在高原地区用于 CRE 同源性分析的初步研究^{*}

何轶群, 黄文辉[△], 李 娟, 赵玲莉, 张 翔, 杨世闻

青海大学附属医院检验科, 青海西宁 810001

摘 要:目的 评价基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)在高原地区对耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)同源性的分析能力。方法 收集 2020 年 1 月于青海大学附属医院重症医学科分离的 5 株碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌和其他科室的 6 株碳青霉烯敏感的肺炎克雷伯菌进行回顾性分析,采用多位点序列分型(MLST)和 MALDI-TOF MS 技术进行同源性分析。结果 两种方法进行同源性分析的结果基本一致,MLST 分析显示 5 株碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌均为 ST11 型,6 株碳青霉烯敏感的肺炎克雷伯菌中 3 株为 ST147 型,2 株为 ST340 型,1 株为 ST1724 型。MALDI-TOF MS 将 11 株肺炎克雷伯菌分为两大类,其中来自重症医学科的 5 株为 I 类,来自其他科室的 6 株为 II 类。结论 MALDI-TOF MS 技术相比 MLST 能更快地对 CRE 同源性分析,能更快对 CRE 院内感染暴发进行诊断。

关键词:基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌; 同源性; 多位点序列分型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.10.023

中图法分类号:R-331

文章编号:1673-4130(2022)10-1264-05

文献标志码:A

近年来耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)引起的院内和社区感染越来越多,其病死率也越来越高。CRE 引起的感染在临床治疗上不仅不好治愈而且病死率较高^[1-2]。CRE 可通过患者与患者、患者与医护人员之间进行相互传播,不仅严重威胁患者的生命健康,而且造成医疗资源的浪费和患者经济负担的加重。及时对院内 CRE 进行同源性分析,是判断其是否存在院内感染及确定传染源的关键。目前用于细菌同源性分析的方法多采用多位点序列分型(MLST)方法。MLST 的优点是重复性好,分辨力高,易于标准化,并可直接进行分析^[3-4],缺点是要提前知道待测菌株基因组序列,并查询该菌株相对应的管家基因。此外检测的高额费用和所需特定的仪器使得 MLST 只能局限在大型的流行病学研究中心,不适用于医院等中小范围的流行病学分析。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)是近年来快速发展起来的一种新型微生物鉴定技术,自 2010 年质谱技术进入国内后得到了飞速发展^[5-8]。MALDI-TOF MS 主要是分析比较细菌的蛋白质指纹图谱,其最大特点是快速、简单、方便,可在几分钟内完成病原菌的同源性分析^[9-10]。本研究通过对青海大学附属医院重症医学科分离的 5 株碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌,以及同期其他科室分离的 6 株碳青霉烯敏感的肺炎克雷伯菌进行 MALDI-TOF MS 和 MLST 同源性分析,通过比较评价 MALDI-TOF MS 在高原地区用于

CRE 同源性分析的能力,从而为高原地区医院感控工作提供一种快速、便捷、经济的同源性分析方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 收集青海大学附属医院 2020 年 1 月分离的肺炎克雷伯菌,其中 5 株碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌来自重症医学科,碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌采用金山川免疫显色表型检测卡进行确认,经确认均为 KPC 酶型的 CRE,6 株碳青霉烯敏感的肺炎克雷伯菌来自其他科室。肺炎克雷伯菌 ATCC10031 由本实验室保存。

1.1.2 培养基 实验所用的血琼脂平板来自赛默飞世尔生物化学制品(北京)公司有限公司。

1.2 仪器与试剂 甲酸、HCCA 基质、三氟乙酸、乙腈购于德国布鲁克公司,PCR 实验所需试剂全部购于上海生工生物工程有限公司。MALDI-TOF MS(德国布鲁克),PCR 扩增仪(美国 Bio-rad),ViteK 2 Compact 全自动细菌鉴定药敏系统(法国梅里埃),凝胶成像仪(美国 Bio-rad),电泳仪(北京六一)。

1.3 方法

1.3.1 MLST 将保存于-20℃冰箱的菌株冻存管中的待测肺炎克雷伯菌转种于血琼脂平板上,35℃培养 24 h 后备用。采用煮沸法提取细菌基因组,具体步骤:无菌挑取备用菌株于 400 μL 的无菌蒸馏水中煮沸 10 min,13 000 r/min 离心 5 min,取上清液做细菌

^{*} 基金项目:国家科技攻关计划(2019FY101200)。

[△] 通信作者, E-mail:344753272@qq.com。

模板 DNA。肺炎克雷伯菌 7 对管家基因 gapA、infB、mdh、pgi、phoE、rpoB 和 tonB，参考 MLST 网址 [https://bigsdb.pasteur. fr/klebsiella/primers _ used. html](https://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella/primers_used.html) 中提供的方法进行扩增，扩增序列上传 MLST 网站进行比对，得到相应的细菌 ST 型，具体引物长度、退火温度和 PCR 产物扩增长度见表 1。

1.3.2 MALDI-TOF MS 同源性分析 将保存于 -20℃ 冰箱的菌株冻存管中的肺炎克雷伯菌转种于血琼脂平板上，35℃ 培养 24 h 后备用。采用甲酸提取法进行菌株处理，用 10 μL 的一次性接种环挑取待测菌株于 1.5 mL 的小型离心管中，加入 300 μL 的去离子水，取待测菌株至小型离心管中，用移液枪反复

吹打，加入 900 μL 的无水乙醇充分混匀，13 000 r/min 离心 2 min，用移液枪弃上清液，整个过程不应触碰沉淀。室温下干燥沉淀 2~3 min，向小型离心管中加入 50 μL 的 70% 的甲酸和 50 μL 的乙腈充分混匀后以 13 000 r/min 离心 2 min，取 1 μL 的上清液于 MALDI 靶板上，晾干后再加 1 μL 的 HCCA 基质晾干后备用。应用 MALDI-TOF MS 软件中的 MALDI Biotyper RTC 软件进行数据采集。通过 MALDI-TOF MS 中的 flexAnalysis 获取蛋白峰信息采集，通过 MALDI Biotyper 3 软件进行聚类分析和主成分分析。

表 1 肺炎克雷伯菌 7 对管家基因序列

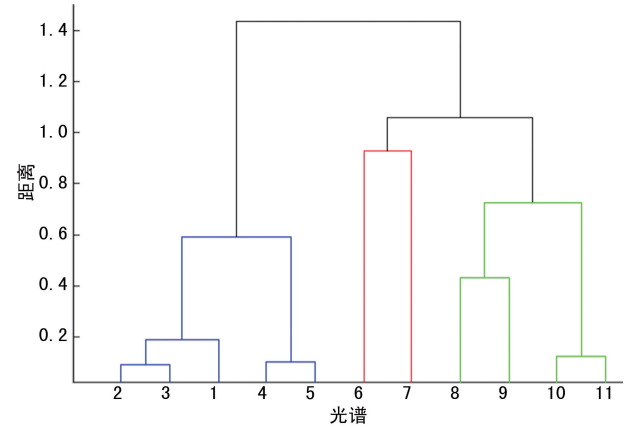
引物	引物序列(5'-3')	退火温度(℃)	PCR 引物大小(bp)
RpoB 上游	GGCGAAATGGCWGAGAACCA	45	501
RpoB 下游	GAGTCTTCGAAGTTGTAACC		
gapA 上游	TGAATATGACTCCACTCTCACGG	60	450
gapA 下游	CTTCAGAAGCGCTTTGATGGCTT		
Mdh 上游	CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG	50	477
Mdh 下游	CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG		
Pgi 上游	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	50	432
Pgi 下游	CGCGCCACGTTTATAGCGGTTAAT		
PhoE 上游	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	50	420
PhoE 下游	TGTCAGAACTGGTAGGTGAT		
infB 上游	CTCGCTGCTGGACTATATTCG	50	318
infB 下游	CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC		
tonB 上游	CTTTATACTCGGTACATCAGGT	45	414
tonB 下游	ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG		

2 结 果

2.1 MLST 分析结果 分析显示来自重症医学科的 5 株碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌均为 ST11 型，来自其他科室的 6 株碳青霉烯敏感的肺炎克雷伯菌中 3 株为 ST147 型，2 株为 ST340 型，1 株为 ST1724 型。

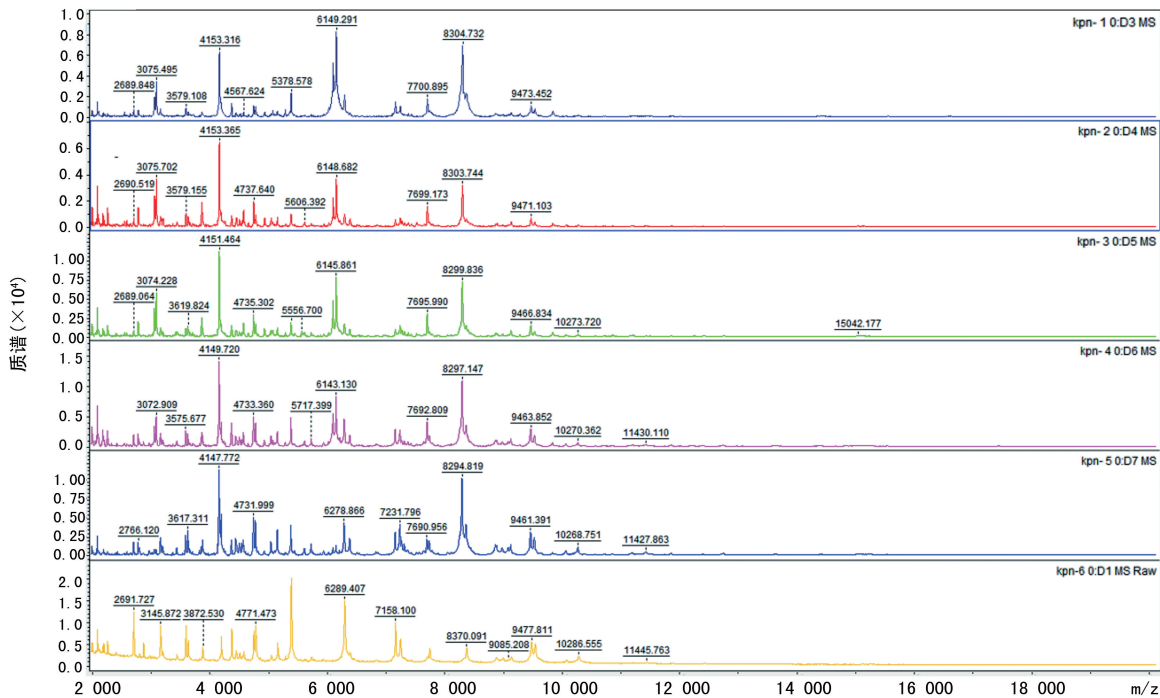
2.2 MALDI-TOF MS 同源性分析结果 应用分析软件 MALDI Biotyper3 对 11 株肺炎克雷伯菌进行聚类分析，结果见图 1，聚类分析后发现 MALDI-TOF MS 将 11 株肺炎克雷伯菌分为两大类，来自重症医学科的 5 株碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌被划分为Ⅰ类，来自其他科室的 6 株肺炎克雷伯菌被划分为Ⅱ类。5 株碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌蛋白质谱见图 2，可以看出来自重症医学科的 5 株碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌的蛋白峰大致一样，并且和肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC10031 的某些蛋白峰有明显差异。主成分三维散点分析见图 3，可以看出 11 株肺炎克雷伯菌处于两个平面，其中 1~5 号为来自重症医学科的 5 株碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌，三维散点图显

示均处于同一个平面且空间距离较近，来自其他科室的 6 株肺炎克雷伯菌处于其他平面，结果提示 5 株来自重症医学科的碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌空间较近，推断亲缘关系较近，可能为同一株来源。



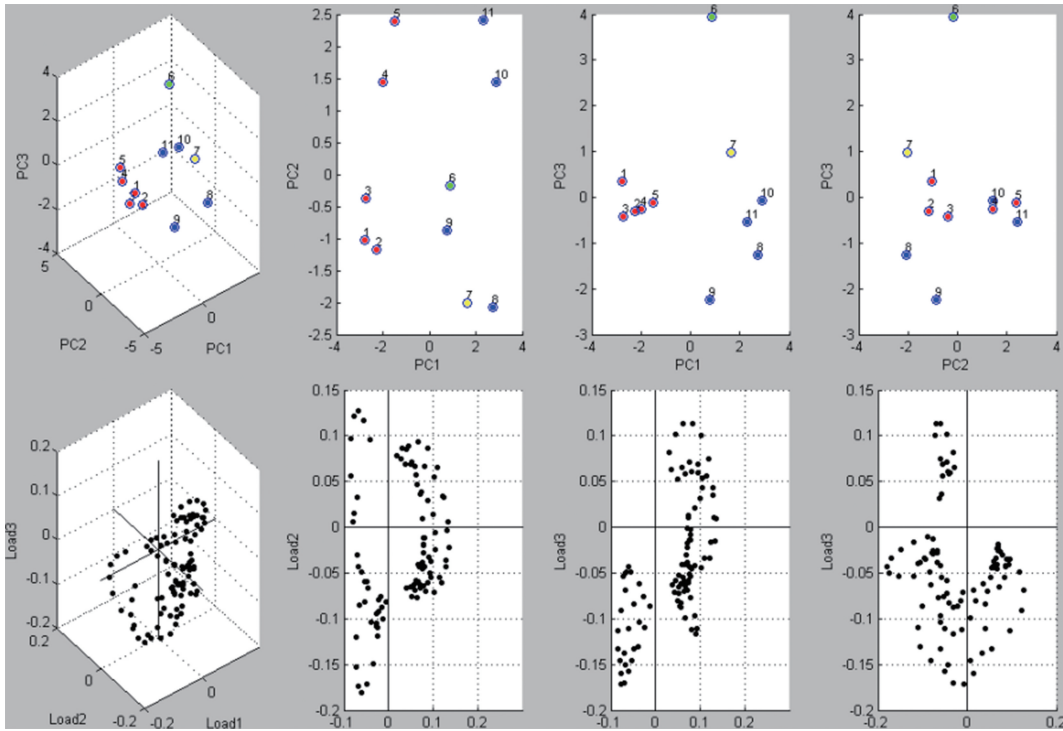
注：1~5 号为来自重症医学科的碳青霉烯耐药的 5 株肺炎克雷伯菌，6~11 号为来自其他科室的碳青霉烯敏感的 6 株肺炎克雷伯菌。

图 1 11 株肺炎克雷伯菌 MALDI-MOF MS 同源性分析图



注:kpn1~kpn5 为 5 株碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌,kpn6 为肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC10031。

图 2 5 株碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌和肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC10031 的蛋白质谱图



注:1~5 号为来自重症医学科的碳青霉烯耐药的 5 株肺炎克雷伯菌,6~11 号为来自其他科室的 6 株肺炎克雷伯菌,PC1 为第一主成分,PC2 为第二主成分,PC3 为第三主成分,Load1 为载荷 1,Load2 为载荷 2,Load3 为载荷 3。

图 3 11 株肺炎克雷伯菌的主成分三维散点图

3 讨 论

目前高原地区应用 MALDI-TOF MS 技术进行 CRE 同源性分析的研究报道较少。本研究采用 MLST 和 MALDI-TOF MS 技术对待测菌株进行同源性分析。MLST 分析结果显示,5 株碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌均为 ST11 型,6 株碳青霉烯敏感的

肺炎克雷伯菌中 3 株为 ST147 型,2 株为 ST340 型,1 株为 ST1724 型。MALDI-TOF MS 将 11 株肺炎克雷伯菌分为两大类,其中来自重症医学科的 5 株为 I 类,来自其他科室的 6 株为 II 类,两种方法在同源性分析方面的结果基本一致。来自重症医学科的 5 株碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌中,其中 3 株来自不同

患者的肺泡灌洗液,1 株来自患者所处环境,1 株来自呼吸机,同源性分析将其归为同一类,提示可能是由于院内消毒不彻底引起的院内暴发,后期的流行病学调查也提示为院内感染。通过后询问临床得知,3 例患者中 2 例死亡,1 例患者病情严重家属放弃治疗后自动出院,这也提示在今后的工作中要重视 CRE 引起的院内交叉感染。

CRE 引起的院内感染暴发在国内外已有很多报道,快速对 CRE 进行同源性分析是控制 CRE 院内感染的重要手段。李冬菊等^[11]应用 MALDI-TOF MS 技术对重症 ICU 病房的怀疑院内感染暴发的 7 株肺炎克雷伯菌进行研究,结果发现 MALDI-TOF MS 技术在同源性分析方面可以和 MLST 分型相媲美,这也和本研究结果一致。国外有学者通过大量的研究得出 MALDI-TOF MS 在病原菌同源性分析方面的准确度与 MLST 相类似^[12-14]。但是应用 MLST 进行同源性分析需要高额费用和特定仪器,以及进行 PCR 扩增后外送测序,使其只能局限在大型的流行病学研究中心,不适用于医院中小范围及高原地区进行同源性和流行病学分析。

虽然本研究发现在高原地区 MALDI-TOF MS 在同源性研究方面和 MLST 分型结果一致,但徐建民等^[15]应用 MALDI-TOF MS 技术分析 95 株肺炎克雷伯菌后得出,该方法虽然能比较直观清晰的分析细菌的同源性,但是其广泛应用于临床菌株同源性分析方面还需要更深入的实验研究。MALDI-TOF MS 主要是通过分析细菌蛋白质表达的特征峰,而菌体蛋白表达可能会受到温度、海拔、培养条件等影响,导致两种方法在同源性分析方面还有差距。

全国细菌耐药监测网数据显示,我国 CRE 检出率逐年呈现上升趋势,其引起的病死率也在逐年增加^[1]。GUDUCUOGLU 等^[16]对某大学医院两个重症 ICU 病房 8 例患者连续分离出的 9 株耐碳青霉烯类抗菌药物耐药的肺炎克雷伯菌进行调查,发现 5 例患者平均于 12 d 内因感染死亡,病死率高达 62.5%。CRE 引起的感染因治疗手段有限,在治疗上不仅难治而且病死率高,只能采取隔离和消毒等措施^[17-20]。青藏高原地区处我国西北,经济和医疗条件相对落后,一旦发生院内 CRE 感染其后果相对严重,故对高原地区疑似发生院内感染暴发的 CRE 快速进行同源性分析,可为院内 CRE 感控提供数据支持。MALDI-TOF MS 因其快速、方便、经济的特点,故在同源性分析方面有一定的潜力,尤其对笔者所在的高原地区的医院有一定的应用推广价值,但需要在今后的研究中加大菌株数量及不同菌种之间的比较,从而更好更快地为院内感控工作服务。

参考文献

- [1] 全国细菌耐药监测网. 2014—2019 年细菌耐药性检测报告[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(1): 15-30.
- [2] KARAMPATAKIS T, TSERGOULI K, IOSIFIDIS E, et al. Forecasting models of infections due to carbapenem-resistant Gram-negative bacteria in an intensive care unit in an endemic area[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2020, 26(4): 485-491.
- [3] 姬小微, 廖亚玲, 毛旭虎, 等. MLST 分析在病原微生物基因分型应用中的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 246-249.
- [4] 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.
- [5] DINGLE T C, BUTLER WU S M. MALDI-TOF MASS spectrometry for microorganism identification[J]. Clin Lab Med, 2013, 33(3): 589-609.
- [6] LING H, YUAN Z, SHEN J, et al. Accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinical pathogenic fungi: a meta-analysis[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(7): 2573-2582.
- [7] ZHOU C, HU B, ZHANG X, et al. The value of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in identifying clinically relevant bacteria: a comparison with automated microbiology system[J]. J Thorac Dis, 2014, 6(5): 545-552.
- [8] LI Y, GU B, LIU G, et al. MALDI-TOF MS versus VITEK 2 ANC card for identification of anaerobic bacteria[J]. J Thorac Dis, 2014, 6(5): 517-523.
- [9] CROXATT A, PRODHOM G, GREUB G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology[J]. FEMS Microbiol Rev, 2012, 36(2): 380-407.
- [10] MURRAY P R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epi-demiology[J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(1): 1626-1630.
- [11] 李冬菊, 朱元祺, 梁冰. MALDI-TOF MS 用于肺炎克雷伯菌同源性分析的初步研究[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(5): 528-532.
- [12] 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.
- [13] BERNASCHI P, DEL CHIERICO F, PETRUCCA A, et al. Microbial tracking of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hospital setting[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2013, 26(2): 463-472.
- [14] JOSTEN M, REIF M, SZEKAT C, et al. Analysis of the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight

mass spectrum of *Staphylococcus aureus* identifies mutations that allow differentiation of the main clonal lineages [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(6):1809-1817.

[15] 徐建民, 蒋虔, 杨哲, 等. MALDI-TOF MS 用于耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌同源性分析的研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(21):2580-2583.

[16] GUDUCUOGLU H, GURSOY N C, YAKUPOGULLARI 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.

[17] NORDMANN P, CUZON G, NAAS T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbap-enemase-producing bacteria [J]. *Lancet Infect Dis*, 2009, 9(4):228-236.

[18] GUPTA N, LIMBAGO B M, PATEL J B, et al. Carbap-enem-resistant *Enterobacteriaceae*; epidemiology and prevention[J]. *Clin Infect Dis*, 2011, 53(1):60-67.

[19] ZHANG Y, WANG Q, YIN Y, et al. Epidemiology of carbap-enem-resistant *Enterobacteriaceae* infections; report from the China CRE Network [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(2):e01882-17.

[20] WANG Q, ZHANG Y, YAO X, et al. Risk factors and clinical outcomes for carbap-enem-resistant *Enterobacteriaceae* nosocomial infections[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2016, 35(10):1679-1689.

(收稿日期:2021-10-19 修回日期:2022-01-21)

• 短篇论著 •

SEMA3B-AS1 在食管鳞状细胞癌中的诊断价值*

毛逸琪¹, 刘 硕¹, 李晓宁¹, 宁云云¹, 史露宾¹, 李世宝^{1,2△}

1. 徐州医科大学医学技术学院, 江苏徐州 221000; 2. 徐州医科大学附属医院检验科, 江苏徐州 221000

摘要:目的 探讨 SEMA3B-AS1 在食管鳞状细胞癌鉴别诊断中的价值及其临床意义。方法 收集 2018 年 9 月至 2019 年 6 月徐州医科大学附属医院入院确诊的 42 例食管鳞状细胞癌和 31 例食管良性疾病患者的血清标本。使用实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)检测食管鳞状细胞癌和食管良性疾病患者血清 SEMA3B-AS1 相对表达水平, 分析其与患者临床病理参数的关系。绘制受试者工作特征(ROC)曲线评估血清 SEMA3B-AS1 在食管鳞状细胞癌的鉴别诊断价值。结果 食管鳞状细胞癌患者血清 SEMA3B-AS1 相对表达水平明显高于食管良性疾病患者($P<0.05$); 血清 SEMA3B-AS1 鉴别食管鳞状细胞癌和食管良性疾病的曲线下面积为 0.899(95%CI 0.832~0.967, $P<0.001$), 灵敏度为 76.47%, 特异度为 93.55%。高表达组与低表达组肿瘤最大径、淋巴结转移情况比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 血清 SEMA3B-AS1 是一项潜在的鉴别食管鳞状细胞癌与食管良性疾病患者的标志物, 血清 SEMA3B-AS1 对食管鳞状细胞癌的鉴别诊断具有较高的临床价值。

关键词: SEMA3B-AS1; 食管鳞状细胞癌; 食管良性疾病

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2022.10.024 **中图法分类号:** R735.1

文章编号: 1673-4130(2022)10-1268-04 **文献标志码:** A

我国是食管癌高发国家, 食管鳞状细胞癌病例占比达 90% 以上^[1-2]。食管癌常见病理类型为食管腺癌和食管鳞状细胞癌。食管鳞状细胞癌患者的总体 5 年生存率在 15%~25%, 但早期诊断其 5 年生存率为 90% 以上^[3-4]。癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 199(CA199)等可作为食管癌的诊断和预后标志物, 但其灵敏度和特异度较低^[5], 而内窥镜具有侵袭性等特点限制了其作为食管癌早期筛查的工具^[6]。因此, 临床需求一种灵敏且易获得的诊断标志物。长链非编码 RNA(lncRNA)是一类非编码 RNA, 长度大于 200 个核苷酸, 不具有保守的阅读框, 因此没有编码蛋白质的能力^[7]。有研究证明, lncRNA 参与调控多种生物

过程, 包括增殖、分化、发育、代谢改变和信号转导等^[8-9]。lncRNA 与许多恶性肿瘤有密切关系^[10-12], SEMA3B-AS1 作为一种 lncRNA, 被证实多种癌症中异常表达, 包括贲门癌、肝细胞癌及食管癌等, 且在食管癌组织与细胞中低表达^[13-15]。本研究旨在通过分析食管鳞状细胞癌与食管良性疾病中血清 SEMA3B-AS1 表达水平的差异, 评估血清 SEMA3B-AS1 在食管鳞状细胞癌的鉴别诊断价值。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2018 年 9 月至 2019 年 6 月徐州医科大学附属医院入院确诊的 42 例食管鳞状细胞

* 基金项目: 江苏省高等学校大学生实践创新训练计划重点项目(201910313022Z)。

△ 通信作者, E-mail: sdjnsblb@xzhmu.edu.cn。