

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.08.002

MALDI-TOF MS 用于耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌的同源性分析*

张河林¹, 张敏², 赵秀林³, 赵平森^{1△}

1. 粤北人民医院检验科, 广东韶关 512026; 2. 广东药科大学临床医学院, 广东广州 510030; 3. 粤北人民医院胃肠外科, 广东韶关 512026

摘要:目的 以脉冲场凝胶电泳(PFGE)为金标准,评价临床实验室应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)对耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌(CRECL)进行同源性分析的可行性。方法 收集 2018 年 8 月至 2019 年 6 月从粤北人民医院住院患者中分离的非重复 CRECL 菌株 10 株,编号 YG1~YG10。利用 Biotyper 3.1 软件对 CRECL 蛋白图谱进行主成分分析(PCA)和核心图谱(MSP)聚类分析,同时进行 PFGE 同源性分析,并将 2 种质谱分型方法所得的结果与金标准对比分析。编号为 YG10 的菌株无法进行 PFGE 分型被排除。结果 PFGE 同源性分析结果与 MALDI-TOF MS 同源性分析结果有较大差异,PFGE 分型结果显示 9 株 CRECL 为不同型;MSP 聚类分析将 9 株 CRECL 分为 3 型(A 型 4 株,B 型 4 株,C 型 1 株),其中 A 型的 YG3 和 YG7,以及 B 型的 YG2 和 YG5 水平线距离均为 0;PCA 聚类分析同样将 9 株 CRECL 分为 3 型(A 型 2 株,B 型 4 株,C 型 3 株)。2 种质谱聚类分析都将 YG3 和 YG6 分到同一型中,而 YG2、YG4 及 YG8 分到另外的同一型中。结论 MALDI-TOF MS 有一定的同源性分型能力,但与 PFGE 同源性分型结果相比较,MALDI-TOF MS 的 2 种同源性分型结果都还有待进一步研究。

关键词:基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 脉冲场凝胶电泳; 耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌; 同源性分析
中图分类号:R446.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2022)08-1014-04

Homology analysis of carbapenem resistant *Enterobacter cloacae* by MALDI-TOF MS*ZHANG Helin¹, ZHANG Min², ZHAO Xiulin³, ZHAO Pingsen^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, Yuebei People's Hospital, Shaoguan, Guangdong 512026, China; 2. School of Clinical Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510030, China; 3. Department of Gastrointestinal Surgery, Yuebei People's Hospital, Shaoguan, Guangdong 512026, China

Abstract: **Objective** To evaluate the feasibility of matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for homology analysis of carbapenem resistant *Enterobacter cloacae* (CRECL) in clinical laboratory using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) as the gold standard. **Methods** Ten non-repetitive CRECL strains isolated from inpatients in Yuebei People's Hospital from August 2018 to June 2019 were collected and numbered YG1—YG10. The principal component analysis (PCA) and main spectra profile (MSP) cluster analysis of CRECL protein maps were performed by Biotyper 3.1 software, and the PFGE homology analysis was also performed. The results of the two mass spectrometry typing methods were compared with the gold standard. The strain numbered YG10 could not be PFGE typed and was excluded. **Results** The results of PFGE homology analysis and MALDI-TOF MS homology analysis showed that there were significant differences between the two methods. The results of PFGE typing showed that 9 strains of CRECL were different types. Nine strains of CRECL were divided into 3 types (4 strains of type A, 4 strains of type B, and 1 strain of type C) by MSP cluster analysis. Among them, the horizontal line distances of YG3 and YG7 of type A, and YG2 and YG5 of type B were all 0. Nine strains of CRECL were also divided into 3 types (2 strains of type A, 4 strains of type B, and 3 strain of type C) by PCA cluster analysis. YG3 and

* 基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFD0500405, 2017YFD0501705);广东省自然科学基金项目(2021A1515012429);广东省医学科研基金立项课题(B2019205);广东省韶关市医药卫生科研计划项目(Y19047)。

作者简介:张河林,男,主管技师,主要从事临床微生物方面的研究。△ 通信作者, E-mail: zhaopingsen01@163.com。

本文引用格式:张河林,张敏,赵秀林,等. MALDI-TOF MS 用于耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌的同源性分析[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(8): 1014-1017.

YG6 were classified into the same type by both mass spectrometry cluster analysis, while YG2, YG4 and YG8 were classified into another same type. **Conclusion** MALDI-TOF MS has certain ability of homology typing, but compared with PFGE homology typing results, the two homology typing results of MALDI-TOF MS need further studies.

Key words: matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry; pulsed field gel electrophoresis; carbapenem resistant *Enterobacter cloacae*; homology analysis

阴沟肠杆菌作为条件致病菌,广泛分布于自然界,是人类正常微生物菌群的一部分,常引起下呼吸道、泌尿道、手术部位和中枢神经系统等感染。该菌可产生超广谱 β -内酰胺酶或质粒介导的 Amp C 酶,由于使用三代头孢菌素容易诱导该酶的高表达,所以临床上常常选用碳青霉烯类药物进行治疗^[1-2]。随着碳青霉烯类抗菌药物在临床上的广泛使用,耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌(CRECL)检出率不断升高,给临床治疗 CRECL 感染带来极大困难。而流行病学分析则是监测感染暴发以及控制医院感染的重要手段^[3]。目前细菌同源性分析的方法多为基因水平,如脉冲场凝胶电泳(PFGE)、多位点序列分型(MLST)等,这些方法分型虽然准确、可靠,但成本高,周转时间长且需要专业的技术人员。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)与上述方法原理不同,不仅能够准确、快速鉴定到属、种,甚至是亚种,而且还具有高通量的特点。目前国内外均有研究报道将 MALDI-TOF MS 技术应用于多重耐药菌的同源性分析^[4-5],但少见用于 CRECL 的同源性分析。本研究旨在明确粤北人民医院病房是否存在 CRECL 的克隆传播,评价 MALDI-TOF MS 的主成分分析(PCA)和核心图谱(MSP)聚类分析用于 CRECL 同源性分析的可行性。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2018 年 8 月至 2019 年 6 月从粤北人民医院住院患者中分离的非重复 CRECL 菌株共 10 株,编号为 YG1~YG10,排除无法进行 PFGE 分型的 YG10,共纳入 9 株菌株(YG1~YG9)。

1.2 仪器与试剂 VITEK 2 Compact(法国梅里埃)全自动微生物分析仪(包括比浊仪)及其配套试剂, Microflex LT(德国布鲁克公司)质谱仪及其配套试剂,药敏纸片(英国 Oxoid 公司),CHEF Mapper XA 脉冲场电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),ChemiDoc MP 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司),内切酶 Xba I 体系(日本 TaKaRa 公司)。

1.3 方法

1.3.1 鉴定及药物敏感试验(简称药敏试验) 临床分离的阴沟肠杆菌同时采用 VITEK 2 Compact 生化鉴定和 Microflex LT 质谱鉴定,药敏试验采用 VITEK 2 Compact 系统的 MIC 法(仪器法)和 K-B

法。结果判读及解释根据 CLSI 文件第 28 版 M100 进行。生化鉴定及药敏的质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922,质谱仪采用布鲁克配套的质控标准品(BTS)。

1.3.2 PFGE 分析 参照文献[6]对细菌进行同源性分析:取 200 μ L 经培养后的菌液与低熔点胶 1:1 包埋,蛋白酶 K 和内切酶 Xba I 在 37 $^{\circ}$ C 水浴中酶切 3 h;PFGE 条件及结果判读标准参考文献[7]。

1.3.3 MALDI-TOF MS 同源性分析 将 9 株(编号 YG1~YG9)阴沟肠杆菌接种于新鲜的血平板,置于 35 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中,持续培养 18~24 h,用灭菌牙签挑取单个菌落的少量细菌均匀涂布在 96 孔金属靶板孔位上,晾干后加 1 μ L 70%甲酸溶液均匀涂覆在标本上,待晾干后再加 1 μ L 基质溶液均匀涂覆在标本上,晾干后把 96 孔金属靶板放入质谱仪中上机检测,检测的结果用 Biotyper 3.1 软件进行同源性分析。

1.4 统计学处理 采用 Excel 2019 软件对数据进行处理。计数资料以率表示。

2 结果

2.1 药敏试验结果 9 株阴沟肠杆菌对头孢呋辛、头孢曲松、氨曲南及头孢吡肟全部耐药,同时对哌拉西林/他唑巴坦和头孢哌酮/舒巴坦(SCF)等 β -内酰胺酶抑制剂合剂也表现出高度耐药;虽然 9 株阴沟肠杆菌都对厄他培南全部耐药,但 YG4 对亚胺培南(IPM)中介,而 YG1 和 YG9 却对亚胺培南敏感。9 株阴沟肠杆菌对氨基糖苷类抗菌药物阿米卡星(AMK)的耐药率(11.1%)相对最低,AMK 具有较好的抗 CRECL 效果;其次,对喹诺酮类抗菌药物左氧氟沙星(LVX)的耐药率为 55.6%,对磺胺类抗菌药物复方磺胺甲噁唑(SXT)的耐药率为 66.7%,但对二者的耐药率均超过了 50.0%。其中 YG2、YG5 和 YG8 的耐药谱一样,具体药敏结果(不同部分)见表 1。

2.2 PFGE 同源性分析结果 根据 PFGE 判读标准(相似度 100%的为同一型别; ≥ 7 个条带有差异被认为在流行病学上无相关性),9 株阴沟肠杆菌之间均存在 7 条以上的条带有差异,其中 YG4 和 YG5 的相似度最高(67%),其他的相似度都低于 50%,因此 9 株阴沟肠杆菌在流行病学上无相关性,分为 9 型,见图 1。

表 1 9 株阴沟肠杆菌的临床分布及部分药敏试验结果

菌株编号	病区	标本类型	LVX		SCF		AMK		IPM		SXT	
			MIC ($\mu\text{g/mL}$)	药敏 结果	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	药敏 结果	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	药敏 结果	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	药敏 结果	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	药敏 结果
YG1	泌尿外科	尿	≤ 0.25	S	28*	S	≤ 2.00	S	≤ 1.00	S	≤ 20.00	S
YG2	ICU	痰	≥ 8.00	R	≥ 64.00	R	≤ 2.00	S	≥ 16.00	R	≥ 320.00	R
YG3	心内科	尿	≥ 8.00	R	≥ 64.00	R	≤ 2.00	S	≥ 16.00	R	≤ 20.00	S
YG4	泌尿外科	静脉血	4.00	I	≥ 64.00	R	16.00	R	8.00	I	≥ 320.00	R
YG5	内分泌科 Δ	痰	≥ 8.00	R	≥ 64.00	R	≤ 2.00	S	≥ 16.00	R	≥ 320.00	R
YG6	新生儿科	气管分泌物	≤ 0.12	S	≥ 64.00	R	≤ 2.00	S	≥ 16.00	R	≥ 320.00	R
YG7	新生儿科	痰	≤ 0.12	S	≥ 64.00	R	≤ 2.00	S	≥ 16.00	R	≤ 20.00	S
YG8	ICU	痰	≥ 8.00	R	≥ 64.00	R	≤ 2.00	S	≥ 16.00	R	≥ 320.00	R
YG9	内分泌科	伤口分泌物	≥ 8.00	R	≥ 64.00	R	≤ 2.00	S	4.00	S	≥ 320.00	R

注:S为敏感;R为耐药;I为中介;*表示抑菌圈(mm); Δ 表示 YG5 来自重症医学科二区,但患者 2018 年 6 月在内分泌科时就已检测出 CRECL,因此 YG5 来自内分泌科;ICU 为重症监护室。

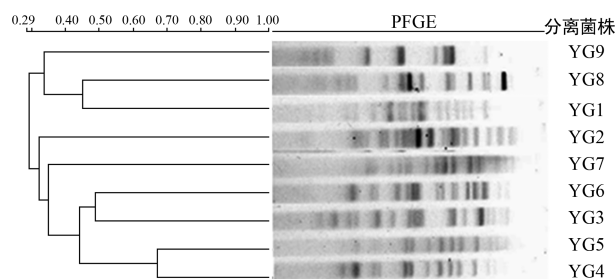


图 1 9 株阴沟肠杆菌 PFGE 图

2.3 MALDI-TOF MS 同源性分析结果 采用 MALDI-TOF MS 分析软件 MALDI Biotyper 3.1 对 9 株阴沟肠杆菌进行同源性分析,比较 9 株菌株质谱蛋白峰的数目与质荷比大小(位置)。MSP 聚类分析树状图显示,以水平线距离 300 作为分型标准,最终将 9 株阴沟肠杆菌分为 3 型:YG1、YG3、YG6 和 YG7 为 A 型,YG2、YG4、YG5 和 YG8 为 B 型,YG9 为 C 型,其中 A 型中的 YG3、YG7 及 B 型中的 YG2、YG5 的水平线距离均为 0,见图 2。PCA 聚类分析树状图显示:YG1 和 YG9 的水平线距离较近,归为 A 型;YG2、YG4、YG7 和 YG8 的水平线距离较近,归为 B 型;YG3、YG5 和 YG6 的水平线距离较近,归为 C 型,见图 3。

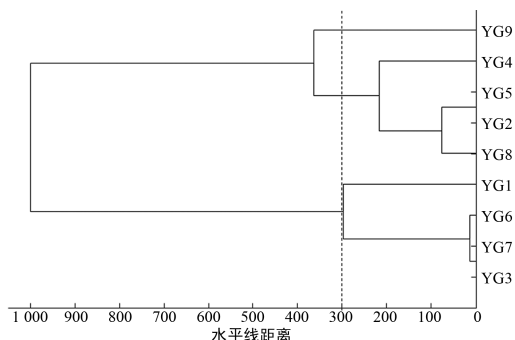


图 2 9 株耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌的 MSP 聚类分析树状图

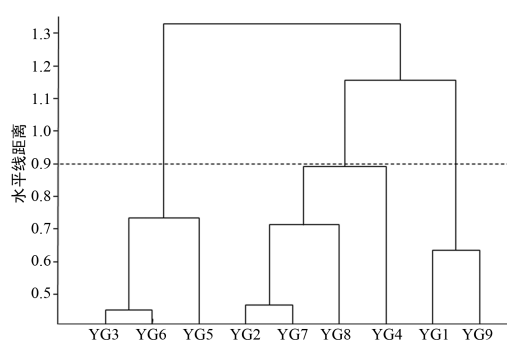


图 3 9 株耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌的 PCA 聚类分析树状图

3 讨论

阴沟肠杆菌是一种重要的条件致病菌,随着头孢菌素在临床的广泛使用,阴沟肠杆菌日渐成为引起医院感染的重要病原体。由于临床治疗中碳青霉烯类抗菌药物使用不规范,部分阴沟肠杆菌出现耐药趋势,严重影响临床抗感染工作^[8-9]。因此,快速鉴定阴沟肠杆菌,对其进行分型,并掌握其流行病学相关信息,对阴沟肠杆菌感染进行控制和治疗十分重要。

PFGE 因为分型指纹图谱图像分辨力强,结果辨识度和重复性好,操作标准化,并且有成熟的分型结果数据库,被国内外分子流行病学者广泛认同,被认为是微生物亚种分类的“金标准”^[10-11],但是由于其对临床工作的指导意义受限,设备要求高,技术操作繁琐,耗时较长等不足,难以在临床实验室推广运用^[12]。而 MALDI-TOF MS 作为一种快速细菌分型的新兴方法,不仅可以鉴定细菌,还可以通过细菌的蛋白质图谱对细菌进行同源性分析,为临床精准防控多重耐药的阴沟肠杆菌提供指导。

本试验以 PFGE 同源性分型为金标准,通过 PFGE 分型,9 株阴沟肠杆菌被分为 9 种不同的型,在流行病学上无相关性。MSP、PCA 聚类分析结果与 PFGE 分型结果相差较大,结果显示 MSP、PCA 聚类分

析与 PFGE 分型基本无关联性。此外,虽然都是质谱分型,但 MSP 聚类分析与 PCA 聚类分析的结果也有很大的差别。MSP 聚类分析显示:YG3、YG7 的水平线距离为 0,推断 2 株为同一克隆菌株的可能性极大;而 YG2、YG5 的水平线距离也为 0,推断 2 株为另外同一克隆菌株的可能性极大。PCA 聚类分析显示:YG3、YG6 水平线距离均小于 0.5,推断 2 株可能为同一克隆菌株来源;而 YG2 和 YG7 的水平线距离也小于 0.5,推断 2 株可能为另外同一克隆菌株来源。MALDI-TOF MS 的 2 种同源性分析将 YG3 和 YG6 分到同一型中,而将 YG2、YG4 和 YG8 分到另外同一型中,与 PFGE 分型结果相差较大。分析其可能原因:(1)PFGE 是通过细菌的 DNA 进行同源性分型,稳定性较好,准确度较高,但在本研究中 YG10 重复 2 次试验后仍不能产生可供分析的电泳条带,无法进行 PFGE 分型,可能是 CRECL 对内切酶 Xba I 产生了抗性或缺乏相应的酶切位点,文献[13]认为这是因 DNA 降解所致,但是文献[14]报道在电泳缓冲液中加入抑制 DNA 降解的硫脲后仍未产生电泳条带,故具体原因有待进一步研究。(2)MALDI-TOF MS 主要是通过检测不同菌株所表现出的独特蛋白峰进行同源性分析,培养时间、温度、环境、检测条件等因素均可影响蛋白质的表达及含量^[15],虽然此次分型所用的蛋白质谱图都是鉴定分值在 2.3 以上的高质量质谱图,但是 PC1+PC2 方差总和却没有达到 80%,这也是导致 MALDI-TOF MS 分型结果与 PFGE 分型结果有所差异的原因之一,但是质谱分型可以对那些不能 PFGE 分型的菌株进行 MSP 聚类分析或 PCA 聚类分析,弥补了 PFGE 分型的不足。因此,在使用 MALDI-TOF MS 进行同源性分型时,需要严格按照实验要求,在标准条件下进行同源性分析。此外文献[16]报道,使用 ClinPro Tools 3.0 软件筛选信噪比、变异系数及质量峰信噪比的比值等符合要求的特征峰来提高质谱分型的灵敏度和特异性。

综上所述,本次研究表明粤北人民医院病房不存在 CRECL 克隆传播,虽然 MALDI-TOF MS 能够对实验菌株进行快速鉴定,也可成功进行同源性分型,有一定的分辨力,但目前还没有统一的标准化质谱操作流程,尚不能对 MSP 聚类分析和 PCA 聚类分析结果下定论。因此,应继续深入研究该技术,探索一个标准化的质谱操作流程,为临床抗感染工作提供一个快速简便的方法。

参考文献

[1] 刘真真,贾楠,李笃军,等.新生儿重症监护室分离的碳青霉烯类耐药阴沟肠杆菌的分子流行病学[J].中华医院感

染学杂志,2019,29(18):2855-2860.

- [2] JIN C, ZHOU F, CUI Q, et al. Molecular characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in a tertiary hospital in China[J]. *Infect Drug Resist*, 2020, 13: 1575-1581.
- [3] 李静,王艳静,贺延娇,等. ICU 患者发生耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌医院获得性肺炎的危险因素[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(2): 163-166.
- [4] 李东菊,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.
- [5] BAR-MEIR M, BERLINER E, KASHAT L, et al. The utility of MALDI-TOF MS for outbreak investigation in the neonatal intensive care unit[J]. *Eur J Pediatr*, 2020, 179(12): 1843-1849.
- [6] 程国平,简雪峰,许德英,等. MALDI-TOF MS 在碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌流行病学分析中的应用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2019, 39(1): 62-66.
- [7] 胡辛兰,陈东杰,吴长生,等. 4 种不同方法用于院内感染肺炎克雷伯菌菌株同源性分析的价值比较[J]. 临床检验杂志, 2019, 37(1): 41-44.
- [8] 欧阳琳,谢丽,钟贞玲. 赣南地区碳青霉烯类耐药阴沟肠杆菌的基因型研究[J]. 当代医学, 2018, 24(21): 79-81.
- [9] DONG J, ZHANG L, ZHOU S, et al. Identification of a multi-resistant *Enterobacter cloacae* strain from diseased crayfish (*Procambarus clarkii*) [J]. *Aquacult Rep*, 2020, 17: 100405.
- [10] 闻海丰,冯忠军,秦瑾,等. 采用 ERIC-PCR 与 PFGE 分析鲍曼不动杆菌基因型和同源性并对比方法学差异[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016, 8(1): 27-31.
- [11] GIACOMETTI F, PIVA S, VRANCKX K, et al. Application of MALDI-TOF MS for the subtyping of *Aerobacter butzleri* strains and comparison with their MLST and PFGE types[J]. *Int J Food Microbiol*, 2018, 277: 50-57.
- [12] 李进,胡韦维,张峰领,等. 多重耐药铜绿假单胞菌的两种同源性分析方法的比较[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(14): 1258-1262.
- [13] 陈百计,姚泽宇,王彤,等. 广州社区人群金黄色葡萄球菌鼻腔携带调查和分子流行特征[J]. 热带医学杂志, 2017, 17(12): 1583-1588.
- [14] 谢跃. MALDI-TOF MS 联合耐药谱, PFGE 对金黄色葡萄球菌的分型研究[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2019: 25-27.
- [15] 胡继红,马筱玲,王辉,等. MALDI-TOF MS 在临床微生物鉴定中的标准化操作专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(4): 241-249.
- [16] 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快速分型[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(3): 206-212.