

· 论 著 ·

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱用于产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌 ST11 分型的研究

李晓红¹, 丁进亚², 刘 杰³, 公彦文⁴, 薛文成⁵, 赵 斌⁶

[摘要] 目的 探讨基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)用于产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌 ST11 分型。方法 收集 2012 年 10 月-2014 年 10 月 5 所医院的 80 株产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌菌株。经多位点序列分析(MLST), 28 株为 ST11 型, 52 株为其他分型(other sequence type, OST)。通过 MSP dendrogram 聚类分析、MALDI Biotyper 建立数据库、ClinPro Tools 建立模型 3 种方法研究 ST11 分型的可能性。结果 MSP dendrogram 聚类分析在距离水平线 1000 处可将 80 株菌聚类分析为两类, 敏感性为 65.78%, 特异性为 92.85%。MALDI Biotyper 数据库验证结果: 18 株 ST11 有 1 株菌分为 OST, 32 株 OST 有 2 株菌被分为 ST11, 敏感性为 89.47%, 特异性为 96.77%。ClinPro Tools 用其余菌株验证模型全部正确, 敏感性和特异性均为 100%。结论 MALDI-TOF MS 可通过 3 种方法区别 ST11 与 OST, 以 ClinPro Tools 软件建立模型的方法最可靠。

[关键词] ST11 型; 肺炎克雷伯菌; 碳青霉烯酶; MALDI-TOF MS

[中图分类号] R378 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2016.03.005

A study of typing ST11 of klebsiella pneumoniae producing carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

LI Xiao-hong¹, DING Jin-ya², LIU Jie³, GONG Yan-wen⁴, XUE Wen-cheng⁵, ZHAO Bin⁶. 1. Clinical Laboratory, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China; 2. Clinical Laboratory, General Hospital of Guangzhou Military Area in Wuhan, Wuhan, Hubei 430070, China; 3. Clinical Laboratory, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing 100026, China; 4. Clinical Laboratory, General Hospital of Jinan Military Command, Jinan, Shandong 260000, China; 5. Clinical Laboratory, General Hospital of Shenyang Military Command, Shenyang, Liaoning 110016, China; 6. General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] **Objective** To study the probability of typing ST11 of klebsiella pneumoniae producing carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Methods** From October 2012 to October 2014, we collected 80 isolates of klebsiella pneumoniae producing carbapenemases. We researched all isolates by MLST finding that 28 isolates were ST11 and 52 isolates were other sequence types. Through MSP dendrogram, creating databases by MALDI Biotyper and building models by ClinPro Tools to analysis the probability of typing ST11. **Results** At the distance level cutoff of 1000, 80 isolates were divided into two clusters. The susceptibility with MSP dendrogram was 65.78%, and the specificity was 92.85%. The results of testing databases were that 1 of 18 ST11 and 2 of 20 OST were false. The susceptibility and the specificity with MALDI Biotyper were respectively 89.47% and 96.77%. The results of checking model with remaining isolates by the ClinPro Tools were all correctly. The susceptibility and specificity were both 100%. **Conclusion** Through three methods, MALDI-TOF MS has detection performance for the ST11 and OST, but ClinPro Tools is the best.

[Key words] ST11; klebsiella pneumonia; carbapenemases; MALDI-TOF MS

基金项目: 辽宁省科技攻关计划(2011225021)

作者单位: 1. 453003 河南新乡, 新乡医学院第三附属医院检验科; 2. 430070 湖北武汉, 广州军区武汉总医院检验科; 3. 100026 北京, 北京军区总医院检验科; 4. 260000 山东济南, 济南军区总医院检验科; 5. 110016 辽宁沈阳, 沈阳军区总医院检验科; 6. 210002 江苏南京, 南京军区南京总医院医务部

通讯作者: 赵 斌, E-mail: 156126607@qq.com

引用格式: 李晓红, 丁进亚, 刘 杰, 等. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱用于产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌 ST11 分型的研究[J]. 东南国防医药, 2016, 18(3): 240-243.

肺炎克雷伯菌是医院感染常见的病原菌, 其多重耐药菌株增加了抗感染治疗的难度。为防止其在院内形成暴发流行, 建立对其快速监测和分型的方法有重要意义^[1-2]。脉冲场凝胶电泳和多位点序列分析(MLST)是常用的肺炎克雷伯菌分型方法, 但均耗时、费力且价格昂贵^[3-4]。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)是新近发展的简便、快速、准确、经济的病原微生物鉴定方法^[5-6]。本文旨在探讨 MALDI-TOF

MS 用于产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌 ST11 分型的可能性。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2012 年 10 月-2014 年 10 月沈阳、北京、武汉、济南等地 5 所医院分离出的 80 株产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌,其中 28 株为 ST11 型,52 株为其他分型。所有菌株改良 Hodge 试验均为阳性。

1.2 仪器 PCR 试剂购自博迈德生物, GeneAmp PCR System 9700PCR 扩增仪(PE 公司,美国);北京赛默飞羊血琼脂培养基;珠海迪尔肉汤培养基;Bruker BioTyper 质谱分析仪、Flexcontrol 3.4、MALDI Biotyper 3.1、ClinPro Tools 软件 3.3.0 版本(布鲁克公司,德国);基质: α -氰基-4-羟基肉桂酸饱和溶液,2.5%三氟乙酸(sigma),70%甲酸,乙腈。

1.3 方法

1.3.1 MLST 分型 参照网站 <http://bigsdbs.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html> 设计 7 对管家基因的引物、PCR 反应体系及参数。产物由北京华大公司进行测序,再将序列结果与 MLST 网站比对,查询得出结果。

1.3.2 样本前处理 所有菌株接种于血琼脂平板,35℃ 孵育 18 h 后,挑取单个菌落转种于 600 μ L 肉汤培养基中孵育 18 h,13 000 \times g 离心 2 min,弃上清液,加入 300 μ L 去离子水混匀,再次离心弃上清液,重复 2 次。加入 300 μ L 去离子水混匀,再加入 900 μ L 乙醇,充分混匀,离心弃上清液。室温下干燥沉淀 2~3 min,加入 70%甲酸 20 μ L 混匀,再加入 20 μ L 乙腈混匀,离心取 1 μ L 上清液和 1 μ L 的基质溶剂混和后置于 96 孔钢制靶板表面晾干后上机。

1.3.3 MALDI-TOF MS 原理 MALDI-TOF MS 的原理是根据特异性保守核糖体蛋白鉴定微生物,在电场和磁场的作用下,测定离子到达检测器的飞行时间而得到质荷比(m/z),其与离子的飞行时间成正比,从而绘出样本的蛋白图谱(指纹图谱),通过与数据库中的指纹图谱相比较来鉴定微生物。用大肠埃希细菌标准品进行曲线校正,检测器范围为 2000~20 000 m/z 。

1.3.4 MSP dendrogram 聚类分析 通过质谱鉴定系统(MALDI Biotyper 软件)对 80 张图谱进行聚类分析得出代表亲缘关系远近的聚类树状图(main spectrum dendrogram, MSP dendrogram),分析菌株间的亲缘性。

1.3.5 MALDI Biotyper 建立数据库 盲选 10 株

ST11 的 20 张图谱(同一株菌选取 2 张,不同的两个靶孔),以及盲选 20 株 OST 的 20 张图谱(1 个菌株选取 1 张),通过 MALDI Biotyper 建立数据库,其余 50 株菌用于验证数据库的敏感性和特异性。

1.3.6 ClinPro Tools 建立模型 盲选 8 株 ST11、20 株 OST,通过 ClinPro Tools 软件中的遗传算法(genetic algorithm, GA)建立模型,并计算模型的交叉效率与可接受度,该软件可以对数据进行坎基线、平滑、标准化、重新校准,以及平均峰值列表计算等自动化前处理,其余 52 株菌用于验证模型。

2 结果

2.1 MSP dendrogram 聚类分析结果 MSP dendrogram 在距离水平线 1000 处将 80 株菌分为两类,其中 42 株菌中包含 39 株 OST,另 38 株菌中包含 25 株 ST11,敏感性为 65.78%,特异性为 92.85%。而在距离水平线 900 处可分为 3 类,分别为 11、31、38 株(图 1)。

2.2 数据库建立及结果 10 株 ST11 和 20 株 OST 各自建立数据库,以此数据库为标准,对剩余菌株进行检测,ST11 组剩余 18 株菌中鉴定正确的有 17 株,OST 组剩余 32 株菌中 2 株鉴定为 ST11,敏感性为 89.47%,特异性为 96.77%。

2.3 模型建立及验证结果 GA 计算所建模型的交叉效率与可接受度均为 100%。软件通过所设参数选出模型中 ST11 的特异性峰有:2761.72、4521.44、5941.94、7790.48、9645.62 m/z 。用其余菌株验证模型,20 株 ST11 和 32 株 OST 全部分型正确,敏感性和特异性为 100%。模型菌株分布见图 2。

3 讨论

MALDI-TOF MS 方法鉴定病原微生物准确性高,且有时间和成本的优势,使其在临床微生物检测领域具有非常广阔的前景。国外已有许多实验室应用于临床实践。文献报道 ClinPro Tools 软件根据质荷比、信噪比、峰下面积等数据对菌株进行分型,且具有较高的敏感性和特异性。如辨别对甲氧西林敏感与耐药的金黄色葡萄球菌^[6]、准确快速地鉴别 5 种高危害克隆型的铜绿假单胞菌^[7]、化脓性链球菌血清型聚类^[8]、以及肺炎支原体亚型分析^[9]。本实验研究探讨了通过质谱仪配置的 MSP dendrogram 聚类分析、MALDI Biotyper 建立数据库、ClinPro Tools 建立模型 3 种方法对产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌 ST11 分型的可能性。

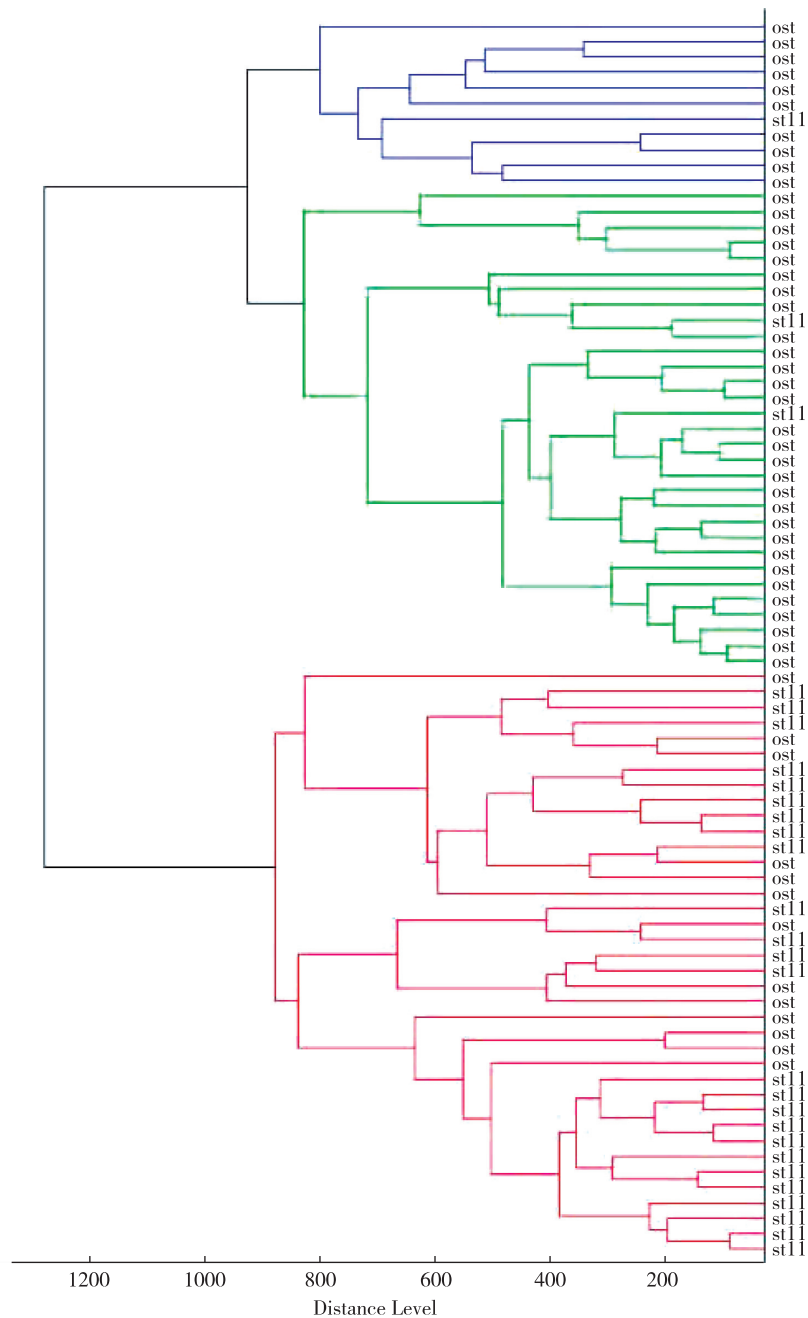


图 1 MSP dendrogram 聚类分析结果图

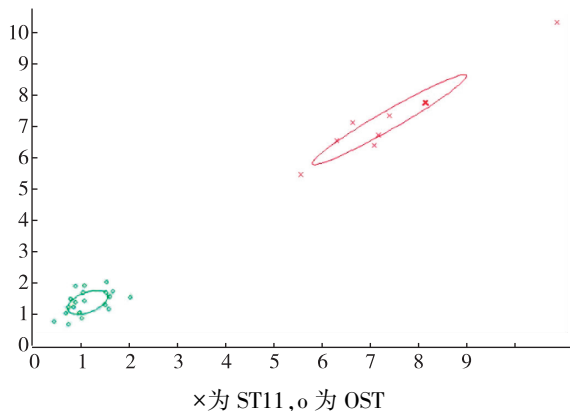


图 2 ST11 与 OST 建立模型菌株分布图

MSP dendrogram 在距离水平线 1000 处可分为两类,28 株 ST11 中有 25 株分为一类,虽然 MSP dendrogram 聚类分析敏感性不高为 65.78%,但特异性为 92.85%,表明该法可把 ST11 与其他型分开。MALDI Biotyper 数据库的建立需要>20 张图谱,由于 ST11 型菌株数量的限制,我们用同一菌株的两张图谱建立数据库。数据库验证结果显示 18 株 ST11 有 1 株菌分错,32 株 OST 中有 2 株菌分错,敏感性为 89.47%,特异性为 96.77%,说明 MALDI Biotyper 建立数据库法能较好地区分 ST11 与 OST,并且该方法最为方便、快速,可在鉴定菌株的同时对菌株

进行分型。有文献报道, MALDI Biotyper 区分产 β -内酰胺类大肠埃希菌 ST131 与 ST405 和 OST 的敏感性为 98.5%, 特异性为 93.9%^[10]。可能本研究的实验组与对照组菌株数量少, 限制了 MALDI Biotyper 区分 ST11 的敏感性, 需进一步收集实验菌株来研究 MALDI Biotyper 区别 ST11 与 OST 的能力。

ClinPro Tools 软件通过遗传算法、快速分类法、神经网络算法 3 种高级数学算法计算所建模型的交叉效应与可接受度。交叉效应是计算模型可靠性的指标, 可接受度是衡量数据通过模型正确分类的指标, 并且代表计算模型的性能, 实验组的可接受度相当于敏感性, 对照组的可接受度相当于特异性^[10]。本研究所建模型的交叉效应与可接受度均为 100%, 并且用剩余菌株验证模型, 显示 ClinPro Tools 可以正确地区分 ST11 和 OST, 敏感性和特异性均为 100%。同时, ClinPro Tools 可以找出模型 ST11 的特异性峰, 分别为 2761.72、4521.44、5941.94、7790.48、9645.62 m/z。软件还可通过受试者工作特征曲线(ROC 曲线)计算 ST11 的曲线下面积, 当 AUC=1 时, 峰值为 2761.73, AUC=0.997 时, 峰值为 4521.42。所以 2761.73 m/z 和 4521.42 m/z 可能是 ST11 的最具特异性峰, 表明 ClinPro Tools 软件可正确、快速地区分出产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌 ST11 型, 并且能够找出其特异性峰。

MALDI-TOF MS 可通过 3 种方法区别 ST11 与 OST, 以 ClinPro Tools 软件建立模型方法最可靠。本研究收集的菌株以 ST11 为主, 其他型别菌株数较少, 故未对其他型别的菌株进行分组鉴别, 有待于进一步研究。质谱分析技术操作简单、成本低、快速准确, 且有文献报道 MALDI-TOF MS 可以快速、准确地检测出产碳青霉烯酶的细菌^[11-12], 可作为检测产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌和对菌株进行克隆分型的方法, 有进一步深入研究的价值。

【参考文献】

[1] 牛冬梅, 周万青, 洪 骏, 等. 自动化药敏系统与 K-B 纸片扩散

法在肠杆菌科细菌中对阿米卡星药敏结果差异的探讨[J]. 东南国防医药, 2015, 17(2): 131-134.

- [2] 于海容, 孟 浩, 许柳柳, 等. 淮海地区慢性阻塞性肺病急性加重期合并下呼吸道感染患者的病原菌特点及药敏分析[J]. 东南国防医药, 2014, 16(5): 499-501.
- [3] 董 方, 宋文琪, 徐桦巍, 等. 对碳青霉烯类抗生素不敏感肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶基因型研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(4): 270-274.
- [4] 张冀霞, 刘颖梅, 陈宏斌, 等. 我国产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的基因型及流行病学研究[J]. 中华内科学杂志, 2014, 53(2): 116-120.
- [5] Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, et al. Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clonal groups by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(4): 1034-1040.
- [6] Wang YR, Chen Q, Cui SH, et al. Characterization of staphylococcus aureus isolated from clinical specimens by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Biomed Environ Sci, 2013, 26(6): 430-436.
- [7] Cabrolier N, Sauget M, Bertrand X, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identifies pseudomonas aeruginosa high-risk clones[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(4): 1395-1398.
- [8] Wang J, Zhou N, Xu B, et al. Identification and cluster analysis of streptococcus pyogenes by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e47152.
- [9] Xiao D, Zhao F, Zhang H, et al. Novel strategy for typing mycoplasma pneumoniae isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry coupled with ClinProTools[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(8): 3038-3043.
- [10] Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, et al. Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clonal groups by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(4): 1034-1040.
- [11] 王利君, 范艳艳, 王 玫, 等. MALDI-TOF MS 检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的应用价值[J]. 中华医学杂志, 2013, 93(26): 2079-2081.
- [12] Hrabák J, Študentová V, Walková R, et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(7): 2441-2443.

(收稿日期: 2016-03-11; 修回日期: 2016-04-25)

(本文编辑: 齐 名; 英文编辑: 王建东)