

· 基础研究 ·

# 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

程国平\*, 简雪峰, 许德英, 郭海军

河南科技大学第一附属医院检验科, 河南 洛阳 471003

**[摘要]** 目的:用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)检测碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKp)同源性,并与脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)和多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)两种检测方法进行对比,探讨质谱在日常工作中的应用价值。方法:选取2017年10—12月从河南科技大学第一附属医院患者分离的以及ICU环境采集的碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌10株,检测8种耐药基因:bla<sub>TEM</sub>、bla<sub>SHV</sub>、bla<sub>CTX-M</sub>、bla<sub>KPC</sub>、bla<sub>IMP</sub>、bla<sub>NDM</sub>、bla<sub>VIM</sub>、bla<sub>OXA</sub>。采用PFGE、MLST和MALDI-TOF MS 3种方法对这些菌株进行同源性分析。结果:PFGE证实10株CRKp均为同一克隆株的传播,ST型同属于ST11。MALDI-TOF MS经过对细菌进行聚类分析和主成分分析可以区分不同型别肺炎克雷伯菌,对同型肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, Kp)的同源性检测在80%左右。结论:MALDI-TOF MS在肺炎克雷伯菌的同源性检测方面可以应用于院内爆发局部感染的监测,与PFGE和MLST两种方法检测结果一致,但需要尽快建立规范的判断标准。

**[关键词]** MALDI-TOF MS;碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌;同源性**[中图分类号]** R378.996**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)01-062-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190111

## Application of MALDI - TOF MS in epidemiological analysis of carbapenem - resistant *Klebsiella pneumoniae*

Cheng Guoping\*, Jian Xuefeng, Xu Deying, Guo Haijun

Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

**[Abstract]** **Objective:** Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) was performed to detect the homology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKp). Compared with pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST), the application value of mass spectrometry in daily work was discussed. **Methods:** Ten strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients in our hospital from October 2017 to December 2017 and collected from ICU environment were collected. Eight resistant genes (bla<sub>TEM</sub>, bla<sub>SHV</sub>, bla<sub>CTX-M</sub>, bla<sub>KPC</sub>, bla<sub>IMP</sub>, bla<sub>NDM</sub>, bla<sub>VIM</sub>, and bla<sub>OXA</sub>) were detected. The homology of these strains was analyzed by PFGE, MLST and mass spectrometry (MALDI-TOF MS), and the results were compared. **Results:** It was confirmed that 10 strains of CRKp were all of the same cloned strains by PFGE, the ST-type of ST11. MALDI-TOF MS could be distinguished from different strains of *Klebsiella pneumoniae* by cluster analysis and principal component analysis. The homology of the same type of *Klebsiella pneumoniae* was about 80%. **Conclusion:** MALDI-TOF MS can be used in the detection of the homology of *Klebsiella pneumoniae* in nosocomial local infection, which is consistent with the results of PFGE and MLST. But it is necessary to establish the standard judgment standard as soon as possible.

**[Key words]** MALDI-TOF MS; carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*; homology

[Acta Univ Med Nanjing, 2019, 39(01):062-066]

**[基金项目]** 河南省中医药科学研究专项课题(2017ZY1005)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: guoping\_cheng163@163.com

近些年来,碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKp)呈逐年上升趋势,中国耐药监测网 CHINET 统计数据表明中国 CRKp 菌株的分离率在过去7年间增长了14倍<sup>[1]</sup>。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)在病原微生物鉴定方面具有快速、准确、灵敏等优点。在细菌分型以及细菌耐药检测和耐药机制研究等方面均有很多临床应用,克隆菌株的分子流行病学研究还较少见。本文以产bla<sub>KPC</sub>型碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌为例,对比MALDI-TOF MS检测与脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)和多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)两种检测方法在细菌流行病学方面的分析能力,探讨质谱在临床中的推广应用价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

选取2017年10—12月从河南科技大学第一附属医院住院患者分离的以及ICU环境监测采集到的、非重复的肺炎克雷伯菌标本10份,其中血标本1份、创口分泌物1份、痰标本5份;环境采集标本包括:呼吸科ICU血气旁键盘鼠标采样1份、呼吸科ICU床档采样1份、呼吸科ICU监护仪采样1份;收集痰标本1份作为阴性对照(药敏结果显示碳青霉烯类药物敏感)。MALDI-TOF MS质控菌株为ATCC8739,大肠埃希菌标准菌株ATCC25922。

#### 1.1.2 试剂和仪器

全自动细菌鉴定仪 VITEK 2 Compact(梅里埃公司,法国);凝胶成像仪及脉冲场凝胶电泳仪(Bio-Rad公司,美国);PCR扩增仪(ABI Applied公司);恒温摇床(Thermo公司,美国);基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(梅里埃公司,法国)。K-B法药敏纸片(Oxoid公司,英国);限制性内切酶 *Xba* I(大连TaKaRa公司)。引物合成公司为上海生工,测序委托上海博尚生物技术有限公司进行。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细菌鉴定和药敏试验

所有菌株鉴定及药敏试验采用法国生物梅里埃公司 VITEK 2 Compact 及 MALDI-TOF MS 鉴定。采用 E-test 法检测亚胺培南及美罗培南 MIC 值,重

新确认菌株是否对碳青霉烯类药物耐药。药敏结果的判读按照美国临床实验室标准化研究所(CLSI)2017推荐标准进行<sup>[2]</sup>。

#### 1.2.2 耐药基因及管家基因检测

本实验中纳入的耐药基因类别包括:bla<sub>TEM</sub>、bla<sub>SHV</sub>、bla<sub>CTX-M</sub>、bla<sub>KPC</sub>、bla<sub>IMP</sub>、bla<sub>NDM</sub>、bla<sub>VIM</sub>、bla<sub>OXA</sub>;首先煮沸法提取细菌DNA,PCR扩增条件,95℃预变性5 min;然后95℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 60 s,35个PCR循环;72℃延伸10 min,PCR扩增引物(bla<sub>TEM</sub>、bla<sub>SHV</sub>、bla<sub>CTX-M</sub>、bla<sub>KPC</sub>、bla<sub>IMP</sub>、bla<sub>NDM</sub>、bla<sub>VIM</sub>、bla<sub>OXA</sub>、gapA、infB、mdh、pgi、phoE、rpoB、tonB)体系和扩增条件参照相关文献<sup>[3]</sup>。

#### 1.2.3 PFGE 同源性分析

参照文献对细菌进行同源性分析<sup>[3]</sup>:取0.2 mL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 酶切37℃,4 h;PFGE条件:0.5×TBE、14℃、电压6 V/cm、电场夹角120°、电流转换时间5~35 s、电泳22 h<sup>[4-5]</sup>。PFGE条带所用标准对照为大肠埃希菌标准菌株ATCC25922。

PFGE分型标准<sup>[6]</sup>:①同一株:酶切图谱间有相同的条带数,被认为是同一型,也是主流型;②紧密相关型:1~3个条带有差异为亚型;③可能相关:4~6个条带有差异被认为是不同型别;④不相关:≥7个条带有差异被认为在流行病学上无相关性。

#### 1.2.4 多位点序列分型(MLST)

参照MLST专业网站<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>,对扩增的7对管家基因gapA、infB、mdh、pgi、phoE、rpoB、tonB PCR产物测序分析,测序结果在肺炎克雷伯菌MLST数据库([http://pubmlst.org/Klebsiella pneumoniae/](http://pubmlst.org/Klebsiella_pneumoniae/))中进行比对,确定其等位基因型及菌株序列型(ST型)。

#### 1.2.5 MALDI-TOF MS检测

将11株(其中1株为阴性对照)肺炎克雷伯菌接种于血平板中,置于35℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,由于MALDI-TOF MS受样本处理方法(如细菌的培养条件和时间)影响较大,查阅文献<sup>[7]</sup>以及经过预实验后确定分别于培养12 h和24 h两个时间进行检测,每个时间复测1次,共检测4次。质控菌株ATCC8739涂在质控位置,将待检菌涂敷在靶板上,均加1 μL基质溶液,室温下晾干,将靶板放入MALDI-TOF质谱仪,进行上机检测,检测的结果用质谱仪软件进行同源性分析。

## 2 结果

### 2.1 细菌鉴定和药敏试验

10株待测菌 KPN1、KPN2、KPN3、KPN4、KPN5、KPN6、KPN7、KPN8、KPN10、KPN11 均为碳青霉烯类抗生素耐药。KPN9 为阴性对照,对碳青霉烯类抗生素敏感(表1)。

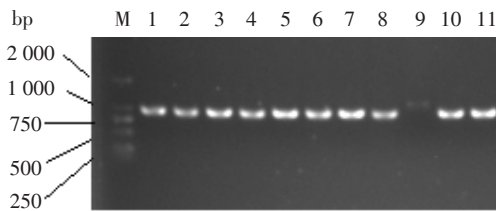
### 2.2 耐药基因检测结果

分别对 11 株肺炎克雷伯菌进行 8 种耐药基因检测, KPN1、KPN2、KPN3、KPN4、KPN5、KPN6、KPN7、KPN8、KPN10、KPN11 均同时携带 bla<sub>KPC</sub>、bla<sub>TEM</sub> 和 bla<sub>SHV</sub> 基因;阴性对照 KPN9 仅携带 bla<sub>SHV</sub> 基因, bla<sub>TEM</sub> 基因未检出,碳青霉烯酶类抗生素耐药基因 bla<sub>KPC</sub> 也未检出(表1,图1)。

表1 11株肺炎克雷伯菌临床资料及菌株特点

Table 1 Clinical data and strain characteristic of 11 strains of *Klebsiella pneumoniae*

菌株编号	标本	诊断	碳青霉烯类抗生素 MIC(μg/mL)		携带耐药基因型别	PFGE 型别	ST 型别
			IMP	MEM			
KPN1	鼠标	/	> 32	> 32	bla <sub>KPC</sub> 、bla <sub>SHV</sub> 、bla <sub>TEM</sub>	A1	11
KPN2	床档	/	> 32	> 32	bla <sub>KPC</sub> 、bla <sub>SHV</sub> 、bla <sub>TEM</sub>	A1	11
KPN3	监护仪	/	> 32	> 32	bla <sub>KPC</sub> 、bla <sub>SHV</sub> 、bla <sub>TEM</sub>	A1	11
KPN4	分泌物	感染性休克	> 32	> 32	bla <sub>KPC</sub> 、bla <sub>SHV</sub> 、bla <sub>TEM</sub>	A1	11
KPN5	痰	重症肺炎	> 32	> 32	bla <sub>KPC</sub> 、bla <sub>SHV</sub> 、bla <sub>TEM</sub>	A2	11
KPN6	血液	重度急性呼吸窘迫综合征	> 32	> 32	bla <sub>KPC</sub> 、bla <sub>SHV</sub> 、bla <sub>TEM</sub>	A1	11
KPN7	痰	慢性阻塞性肺病急性加重	> 32	> 32	bla <sub>KPC</sub> 、bla <sub>SHV</sub> 、bla <sub>TEM</sub>	A2	11
KPN8	痰	心功能不全	> 32	> 32	bla <sub>KPC</sub> 、bla <sub>SHV</sub> 、bla <sub>TEM</sub>	A1	11
KPN9	痰	脑梗,脑疝	0.4	0.4	bla <sub>SHV</sub>	B	23
KPN10	痰	急性脑干梗塞	> 32	> 32	bla <sub>KPC</sub> 、bla <sub>SHV</sub> 、bla <sub>TEM</sub>	A2	11
KPN11	痰	重症肺炎	> 32	> 32	bla <sub>KPC</sub> 、bla <sub>SHV</sub> 、bla <sub>TEM</sub>	A2	11



M: DNA marker; 1~11: 待测菌株 KPN1~KPN11。

图1 11株肺炎克雷伯菌 bla<sub>KPC</sub> 基因 PCR 图

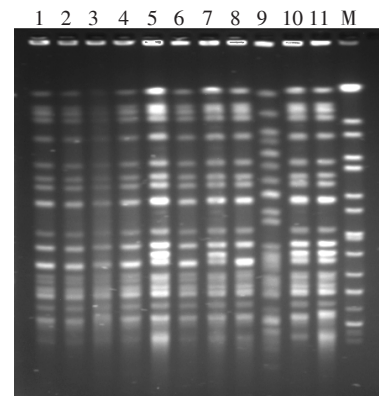
Figure 1 PCR diagram of bla<sub>KPC</sub> gene in 11 strains of *Klebsiella pneumoniae*

### 2.3 PFGE 结果

PFGE 电泳图谱判读结果: 11 株 KPN 菌株共划分为 2 种脉冲带型(A 型和 B 型): A 型又分为 A<sub>1</sub> 亚型与 A<sub>2</sub> 亚型; A<sub>1</sub> 亚型有 6 株, 即: KPN1、KPN2、KPN3、KPN4、KPN6、KPN8, 脉冲带型之间无条带差别; A<sub>2</sub> 亚型有 4 株菌株: KPN5、KPN7、KPN10、KPN11, 脉冲带型之间无差别, A<sub>1</sub> 与 A<sub>2</sub> 之间有 1 个条带差异; B 型有 1 株, 即阴性对照 KPN9。A 型和 B 型之间有超过 7 条以上的条带差异, A 型与 B 型之间在流行病学上无相关性(图2)。

### 2.4 MLST 结果

11 株肺炎克雷伯菌, 只有阴性对照 KPN9 属于



M: 大肠杆菌 25922; 1~11: 待测菌株 KPN1~KPN11。

图2 11株肺炎克雷伯菌 PFGE 图

Figure 2 PFGE of 11 strains of *Klebsiella pneumoniae*

ST23 型, 其余 10 株 KPN1、KPN2、KPN3、KPN4、KPN5、KPN6、KPN7、KPN8、KPN10、KPN11 均为 ST11 型(表1)。

### 2.5 MALDI-TOF MS 检测

用 MALDI-TOF MS RUO 系统软件对采集的样品图谱进行比对分析, 结果发现 10 株菌株的主要蛋白峰信息大致相同(图3), 与未携带 bla<sub>KPC</sub> 耐药基因的阴性对照菌株及质控菌株在某些蛋白峰上都存

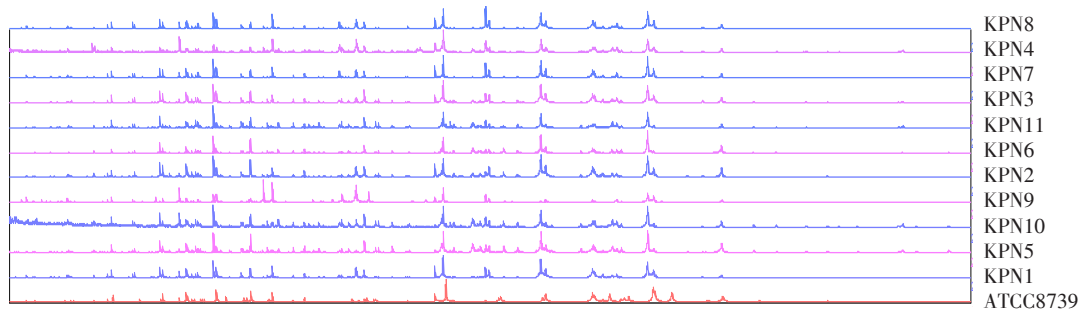
在着明显差异,分析不同型别肺炎克雷伯菌(10株ST型为11的肺炎克雷伯菌与1株ST型为23的对照菌株)同源性仅50%左右(图4)。10株待测标本KPN1、KPN2、KPN3、KPN4、KPN5、KPN6、KPN7、KPN8、KPN10、KPN11同源性在70%~90%之间,大多菌株的同源性在80%左右(图4),均未低于70%。目前尚无质谱分析细菌同源性的标准,梅里埃MALDI-TOF MS操作指南SOP:根据建库同一菌株重复质谱的相似性达70%或以上的标准判断,10株肺炎克雷伯菌同源。

### 3 讨论

bla<sub>KPC</sub>酶编码基因位于细菌的质粒上,这些质粒还可携带其他耐药基因,如bla<sub>SHV</sub>和bla<sub>TEM</sub>,这使得其往往同时产生其他β-内酰胺酶,而成为耐包括碳青霉烯类抗生素在内的泛耐药菌株。菌株在获得耐药性质粒后又很容易将其传播给其他菌株,易造成局部爆发和大范围流行<sup>[8]</sup>。

目前被广泛认可的基因分型方法有PFGE、MLST等,PFGE能够对整个染色体DNA进行分析,其重复性好、分辨率高、结果稳定、易于标准化,被

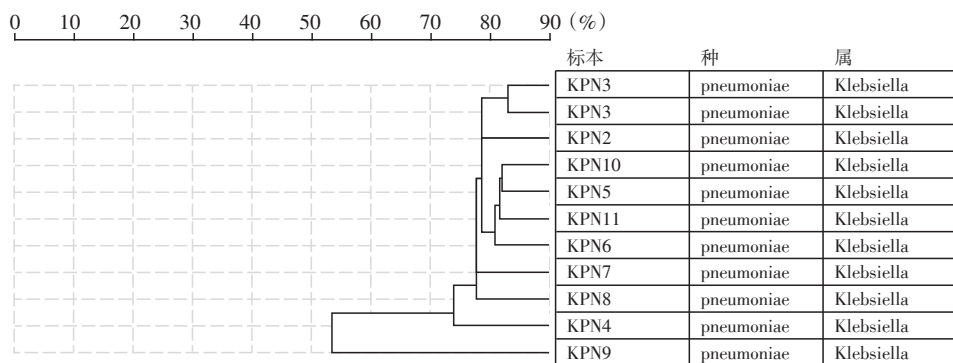
誉为细菌同源性分析和分型的金标准<sup>[9]</sup>。MLST易于标化,可进行室间比较<sup>[10]</sup>。上述两种方法由于耗时长、成本高、操作繁琐等,难以实现快速同源性分析。MALDI-TOF MS是以细菌蛋白质指纹图谱为依据进行鉴定和同源性分析的,有研究结果显示MALDI-TOF MS的同源性分析能力可与PFGE相媲美<sup>[11]</sup>。通过分析特征性的蛋白峰之间的微小差异,可在细菌种内进一步分型<sup>[12]</sup>,进行溯源性分析,判断是否发生院内暴发流行,因此被认为是一种新型的快速细菌分型方法<sup>[12-13]</sup>。本试验用MALDI-TOF MS分析同型的10株肺炎克雷伯菌,显示相似性高于建库同一菌株重复质谱检测的70%的标准。由于目前还没有MALDI-TOF MS在分析细菌同源性方面的标准,本研究为寻找一种检测临床患者携带的以及环境中存在的具有同源性肺炎克雷伯菌的新方法做出初步尝试。Wolters等<sup>[14]</sup>对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的蛋白质谱图进行了聚类分析,其分型结果与金黄色葡萄球菌A蛋白(staphylococcal protein A, SPA)分型结果基本一致。有学者采用质谱标准的直接涂片法和目标蛋白提取法,从培养



阴性对照:KPN9;质控菌株:大肠埃希菌标准菌株 ATCC8739。

图3 11株肺炎克雷伯菌的蛋白质谱图

Figure 3 Protein spectra of 11 strains of *Klebsiella pneumoniae*



待测标本:KPN1、KPN2、KPN3、KPN4、KPN5、KPN6、KPN7、KPN8、KPN10、KPN11;阴性对照:KPN9。

图4 质谱分析11株肺炎克雷伯菌同源性

Figure 4 Mass spectrometry analysis of homology of 11 strains of *Klebsiella pneumoniae*

的菌株中提取 24 h 样品,进行测量和数据分析,KPC 阳性的 ST 258 分离物可分为独立的谱系<sup>[15]</sup>。由于 MALDI-TOF MS 在样本处理方法,如细菌培养条件和时间、蛋白提取方法步骤以及点样方法等方面均会造成质谱图中峰点和峰强度、信噪比等参数的差异<sup>[16]</sup>,需在进一步试验中进行改进从而获得更好的结果。

MALDI-TOF MS 应用于临床病原微生物检验领域已经成为未来发展趋势,具有样本准备过程简单、耐用且重复性高、高度配合有特殊要求使用者等显著优势,如试验条件摸索成熟,具备相应的同源性判断标准,应该可以用于鉴定细菌的同源性,调查传播途径,促使我们尽早对感染的暴发进行控制。

#### [参考文献]

- [1] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2013年中国CHINET细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2014,14(5):365-374
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100S. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-seventh edition[S]. Wayne, Pa: CLSI, 2017
- [3] 陈金云,傅鹰,杨青,等. KPC-2及IMP-4酶介导肠杆菌科细菌碳青霉烯类耐药研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2015,35(6):419-426
- [4] Piekarska K, Zacharczuk K, Szych J, et al. Dissemination of the KPC carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Warsaw, Poland [J]. Med Dosw Mikrobiol, 2010, 62(1): 9-20
- [5] 朱佩琼,蒋琰,王燕飞,等. 质粒介导产超广谱β-内酰胺酶肺炎克雷伯菌对磷霉素的耐药情况及其机制[J]. 中华传染病杂志,2016,34(5):288-291
- [6] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239
- [7] 李冬菊. MALDI-TOF MS 在院内感染病原菌流行病学分析中的应用研究[D]. 青岛:青岛大学,2016:5-8
- [8] Lee JH, Bae IK, Lee SH. New definitions of extended-spectrum β-lactamase conferring worldwide emerging antibiotic resistance [J]. Med Res Rev, 2012, 32(1): 216-232
- [9] Olive DM, Bean P. Principles and application of methods for DNA-based typing of microbial [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(6): 1661-1669
- [10] 姬小薇,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
- [11] 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
- [12] Bader O. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology [J]. Proteomics, 2013, 13(5): 788-799
- [13] Jadhav S, Bhave M, Palombo EA. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes* [J]. J Microbiol Methods, 2012, 88(3): 327-341
- [14] Woltes M, Rohde H, Maier T, et al. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages [J]. Int J Med Microbiol, 2011, 301(1): 64-68
- [15] Sachse S, Bresan 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
- [16] 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

[收稿日期] 2018-09-10