

MALDI-TOF MS 在新生儿血流感染恶臭假单胞菌 同源性分析中的应用

刘健龙, 李先斌, 刘灿, 胡琼, 莫丽亚

湖南省儿童医院检验中心, 湖南 长沙 410007

摘要: **目的** 探讨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)技术在新生儿血流感染恶臭假单胞菌同源性分析中的应用。**方法** 收集湖南省儿童医院新生儿病区 7 株新生儿血流感染恶臭假单胞菌株,利用 VITEK -Compact 2 检测药敏结果;运用 MALDI-TOF MS 及 SARAMIS 软件检测及分析该批恶臭假单胞菌的同源性;同时运用全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)的方法来验证 MALDI-TOF MS 分析结果。**结果** 7 株恶臭假单胞菌对头孢三代以上抗生素及碳青霉烯类抗生素均不敏感,对阿米卡星及左氧氟沙星都敏感。通过运用 MALDI-TOF MS 及 SARAMIS 软件发现该 7 株恶臭假单胞菌为同一型的相对相似度在 80%~90%之间。WGS 分析发现:该 7 株恶臭假单胞菌多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)均为 128 型,平均核苷酸相似度(average nucleotide identity, ANI)>99.9%。**结论** 本次研究的 7 株恶臭假单胞菌有相似的耐药表型, MALDI-TOF MS 发现他们为同一型的相对相似度在 80%~90%之间, WGS 验证他们为同一菌株来源; MALDI-TOF MS 可以对恶臭假单胞菌进行初步、快速的同源性分析。

关键词: 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱;新生儿;恶臭假单胞菌;全基因组测序;同源性分析

中图分类号: R722.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2022)12-1484-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2022.12.018

Application of MALDI-TOF MS to homology analysis of *Pseudomonas putida* in neonatal bloodstream infection

LIU Jian-long, LI Xian-bin, LIU Can, HU Qiong, MO Li-ya

Department of Laboratory Medicine, Hunan Children's Hospital, Changsha, Hunan 410007, China

Corresponding author: MO Li-ya, E-mail: mly7432@aliyun.com

Abstract: **Objective** To explore the application of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in homology analysis of *Pseudomonas putida* in neonatal bloodstream infection. **Methods** Seven strains of *Pseudomonas putida* in neonatal bloodstream infection were collected from neonatal ward of Hunan Children's Hospital. VITEK-compact 2 was used to detect drug sensitivity. MALDI-TOF MS and SARAMIS software were employed to detect and analyze the homology of the *Pseudomonas putida* strains. Meanwhile, whole genome sequencing (WGS) was applied to verifying the analysis results of MALDI-TOF MS. **Results** The 7 *Pseudomonas putida* strains were not sensitive to third- and fourth-generation cephalosporins and carbapenem antibiotics, but sensitive to amikacin and levofloxacin. By using MALDI-TOF MS and SARAMIS software, it was found that the relative similarity in the 7 *Pseudomonas putida* strains ranged from 80% to 90%. WGS analysis revealed that all the 7 *Pseudomonas putida* strains were MLST-128, with an average nucleotide identity (ANI) being >99.9%. **Conclusion** The 7 *Pseudomonas putida* strains in this study had similar drug resistance phenotypes. MALDI-TOF MS found that they were of the same type with the relative similarity being 80%-90%. WGS confirmed that they were from the same strain. MALDI-TOF MS can be used for preliminary and rapid homology analysis of *Pseudomonas putida*.

Keywords: MALDI-TOF MS; neonate; *Pseudomonas putida*; whole genome sequencing; homology analysis

假单胞菌属是一种需氧革兰氏阴性非发酵杆菌,能够在土壤、植物(包括水果和蔬菜)、动物组织和水

作者简介: 刘健龙(1978-),男,湖南湘乡人,副主任技师,主要从事临床微生物研究工作。

通信作者: 莫丽亚, E-mail: mly7432@aliyun.com。

中寄生,其中恶臭假单胞菌在环境中普遍存在,但很少感染人类^[1]。恶臭假单胞菌是一种条件致病菌,其致病性很低,但是,现已被认为是一种与医院感染相关的病原体,特别容易引起免疫缺陷患者如恶性血液病或粒细胞减少患者的感染^[2]。恶臭假单胞菌的毒力较低,其引起的感染常常是医源性的,与被污染的液体、

药品、血液制品的使用或与留置导管的存在有关^[3],这对医院感染控制提出了挑战。本研究收集了 7 例湖南省儿童医院新生儿血流感染的恶臭假单胞菌株,运用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)对其进行同源性分析,结果如下。

1 对象与方法

1.1 对象 收集 2020 年 10 月—2021 年 3 月在湖南省儿童医院就诊并明确诊断为血流感染的新生儿患者的病原菌—恶臭假单胞菌,共 7 株;患者均来自新生儿病区的四个病房。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器 梅里埃 VITEK -Compact 2 全自动细菌鉴定及药敏分析仪、3D 240 血培养仪及配套血培养瓶、VITEK MS 质谱仪、GN 鉴定卡和 GN335 药敏卡、α-氰基-4-羟基肉桂酸基质液 CHCA 均购自法国生物梅里埃公司;细菌全基因组测序委托上海元莘生物医药科技有限公司进行。

1.2.2 菌株鉴定和药敏试验 菌株鉴定使用VITEK-Compact 2 分析仪及 VITEK MS 质谱仪完成;药敏试验使用 VITEK -Compact 2 分析仪完成。药敏结果根据美国临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standard Institute ,CLSI)2020 版标准进行判断。

1.2.3 MALDI-TOF MS 收集到的 7 株恶臭假单胞菌分别接种于哥伦比亚血平板,培养 18~24 h 后挑取单个菌落涂抹到质谱靶板上,加 1 μl CHCA 基质液与之结合,待基质液完全干燥后再放入质谱仪器内进行检测。质谱区间设定的质核比(M/Z)为 3 000~20 000 Da,采用 Vitek MS 切换器将质谱仪的配置从 IVD(临床库)设置为研究方式 RUO(科研库)。仪器运行时,主要是用标准仪器设置进行光谱采集和峰值检测,一旦检测光谱被仪器自带 Launchpad@ 软件处理,则会生成峰值列表而被转移到 SARAMIS 软件的专用文件夹中,最终数据通过 SARAMIS 软件自动分析,并进行物种鉴定。在每个试验中,所有分离株会重复检测 3 次。质控品为大肠埃希菌 ATCC 8 739,通过梅里埃公司的技术服务,每 30 d 对激光装置进行微调,以确保质谱采集的质量不变。

1.2.4 MS 数据分析 把光谱手动导入到 SARAMIS RUO 数据库,作为峰值列表被加载到 SARAMIS 数据库中。在切换到 SARAMIS 高级软件的光谱模式后,按照制造商的说明进行聚类分析,利用该软件的搜索功能,将导入的光谱移到数据库的一个单独的文件夹中,

用三个单一的光谱来生成每个菌株的一致光谱,至少有 110 个峰的光谱被用于进一步的分析。一致光谱只包括一批谱中高频记录的质量信号,频率阈值设置为 100%,而且只考虑了在所有三个重复检测中记录的质量信号。通过应用 0.08% 的质量精度作为 SARAMIS 软件峰值的标准设置,取质量信号的相对强度的平均值,选择 3 000~20 000 m/z 值的峰值范围进行最终分析。将一致光谱应用 SARAMIS 高级软件的相对分类分析工具,得到相对差异和相似性树状图(匹配质量的百分比)。

1.2.5 全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)和数据分析 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(OMEGA公司)根据操作说明提取 DNA。通过 Qubit 荧光定量仪检测保证 DNA 样本浓度>20 ng/μl,总量 ≥ 2.0 μg, A260/A280 = 1.8~2.0。采用 NEB Next Ultra DNA,文库构建试剂盒(美国 illumina 公司)进行文库构建。利用 Illumina Novaseq™测序平台进行 2×150 bp 的双端测序;测序深度 200×左右[具体每个样本的覆盖度计算:Total_Bases(bp)/基因组大小(bp)]。测序仪: Illumina NovaSeq 6000, 测序策略: PE150。WGS 委托上海元莘生物医药科技有限公司进行。

2 结 果

2.1 病原菌鉴定及药敏分析 VITEK -Compact 2 分析仪及 VITEK MS 质谱仪鉴定该 7 株细菌均为恶臭假单胞菌;对头孢三代以上抗生素及碳青霉烯类抗生素均不敏感;对阿米卡星及左氧氟沙星都敏感。从药敏结果初步判断该 7 株细菌具有相同的耐药表型,见表 1。

表 1 7 株恶臭假单胞菌对抗菌药物的敏感结果

抗菌药物	药敏方法	1	2	3	4	5	6	7
头孢他啶	MIC 法	R	R	R	R	R	R	R
头孢吡肟	MIC 法	R	R	I	R	R	I	R
哌拉西林/他唑巴坦	MIC 法	R	R	R	R	R	R	R
亚胺培南	MIC 法	R	R	R	R	R	R	R
阿米卡星	MIC 法	S	S	S	S	S	S	S
左氧氟沙星	MIC 法	S	S	S	S	S	S	S

注:R 为耐药;I 为中介;S 为敏感。

2.2 MALDI-TOF MS 同源性分析 通过运用 MALDI-TOF MS SARAMIS 软件对 7 株恶臭假单胞菌的一致性光谱进行系统树状图分析显示:该 7 株恶臭假单胞菌为同一型的相对相似度在 80%~90%之间,见图 1。

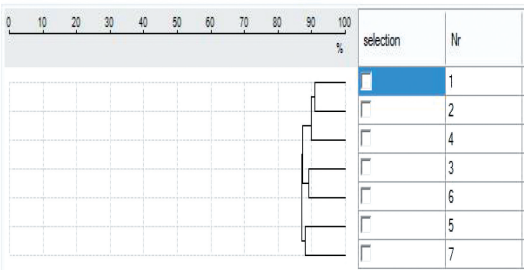


图 1 7 株恶臭假单胞菌 MALDI-TOF MS 同源性分析结果

2.3 WGS 同源性分析 将 7 株恶臭假单胞菌 WGS 测序结果在网站:“<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>”搜索发现:该 7 株恶臭假单胞菌均为 MLST-128 型。平均核苷酸相似度 (average nucleotide identity, ANI) > 99.9%, 见表 2、图 2。

表 2 7 株恶臭假单胞菌 WGS 分型结果

Gene	1-分型	2-分型	3-分型	4-分型	5-分型	6-分型	7-分型
<i>argS</i>	<i>argS_5</i>	<i>argS_5</i>	<i>argS_5</i>	<i>argS_5</i>	<i>argS_5</i>	<i>argS_5</i>	<i>argS_5</i>
<i>gyrB</i>	<i>gyrB_85</i>	<i>gyrB_85</i>	<i>gyrB_85</i>	<i>gyrB_85</i>	<i>gyrB_85</i>	<i>gyrB_85</i>	<i>gyrB_85</i>
<i>ileS</i>	<i>ileS_47</i>	<i>ileS_47</i>	<i>ileS_47</i>	<i>ileS_47</i>	<i>ileS_47</i>	<i>ileS_47</i>	<i>ileS_47</i>
<i>nuoC</i>	<i>nuoC_81</i>	<i>nuoC_81</i>	<i>nuoC_81</i>	<i>nuoC_81</i>	<i>nuoC_81</i>	<i>nuoC_81</i>	<i>nuoC_81</i>
<i>ppsA</i>	<i>ppsA_33</i>	<i>ppsA_33</i>	<i>ppsA_33</i>	<i>ppsA_33</i>	<i>ppsA_33</i>	<i>ppsA_33</i>	<i>ppsA_33</i>
<i>recA</i>	<i>recA_100</i>	<i>recA_100</i>	<i>recA_100</i>	<i>recA_100</i>	<i>recA_100</i>	<i>recA_100</i>	<i>recA_100</i>
<i>rpoB</i>	<i>rpoB_13</i>	<i>rpoB_13</i>	<i>rpoB_13</i>	<i>rpoB_13</i>	<i>rpoB_13</i>	<i>rpoB_13</i>	<i>rpoB_13</i>
<i>rpoD</i>	<i>rpoD_80</i>	<i>rpoD_80</i>	<i>rpoD_80</i>	<i>rpoD_80</i>	<i>rpoD_80</i>	<i>rpoD_80</i>	<i>rpoD_80</i>

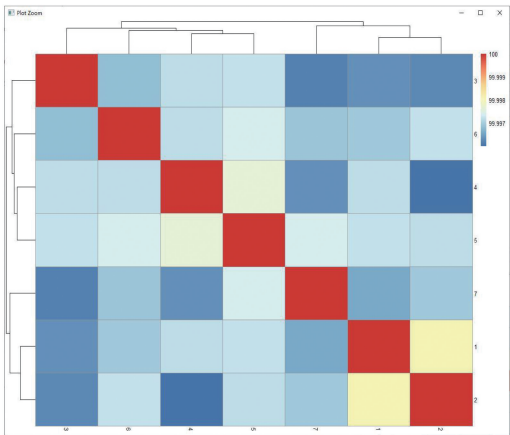


图 2 7 株恶臭假单胞菌 ANI 结果

3 讨论

恶臭假单胞菌多存在于环境中,但在医院患者的尿、痰、血、伤口分泌物、腹膜液、脑脊液、脐拭子等人体组织中均检测到了恶臭假单胞菌^[4-6]。恶臭假单胞菌的毒力不如铜绿假单胞菌,但其引起的感染在患有严重疾病或免疫功能障碍的患者中可能是致命的。最近的一份报告表明,包括恶臭假单胞菌在内的多个假单

胞菌可以分泌类毒素并引起巨噬细胞死亡^[7]。Molina 等^[8]报道了恶臭假单胞菌的临床分离株,含有一组在氧化应激条件下可以生存和通过氨基酸代谢及毒素/抗毒素系统抵抗杀菌剂的基因。该菌的多重耐药以及碳青霉烯类耐药的分离菌株与医院感染有关。彼得等^[9]报道,从血液肿瘤疾病患者中分离出的恶臭假单胞菌中有 46.1% 含有金属 β -内酰胺酶基因。虽然喹诺酮类药物能有效治疗包括假单胞菌在内的医院感染性疾病,但是也有一些恶臭假单胞菌株对喹诺酮类药物产生了耐药性^[10]。

从本研究中的这 7 株恶臭假单胞菌的药敏实验结果来看,他们对头孢三代以上抗生素及碳青霉烯类抗生素均不敏感;对阿米卡星及左氧氟沙星都敏感,可以初步判断该 7 株细菌具有相同的耐药表型。查阅该 7 例患者病例资料获悉:均使用了敏感抗生素阿米卡星或联用第四代头孢菌素一周后好转出院。从治疗的结局来看,该菌虽然体外实验对抗生素呈高度耐药,但其毒力或致病力不强,在联用敏感抗生素一定疗程后,患者均好转出院。

虽然从耐药表型可以初步判断这 7 株细菌有相同的耐药表型,但是却不能判断他们是否同源,就医院感染控制而言,对该类细菌快速准确的同源性检测是急需的。MALDI-TOF MS 是近年来广泛应用于临床微生物鉴定的一种新技术^[11],MALDI-TOF MS 具有临床及科研库两个操作模块,在科研库操作模块下可以对细菌进行快速同源性分析,质谱微生物分型主要是基于菌株的质谱图(质核比及峰强度)。不同来源、不同类型的菌株在质谱图上有可能呈现共性的特征,因此具有同种来源或型别共性特征的菌株即可采用质谱分析法进行同源性分析^[12]。对该 7 株恶臭假单胞菌的质谱同源性分析结果显示:该 7 株菌同源的可能性在 80%~90% 之间。MALDI-TOF MS 对于细菌同源性分析的应用还在摸索之中,李鑫等^[13]认为:BioNumeric 软件和 SARAMIS 数据库软件对 MALDI-TOF MS 结果的同源性分析可作为具有高度同源性和非同源菌株间同源性的初步筛选方法,但仍需其他方法验证;对同源关系多样的菌株,上述方法不稳定,不适于进行菌株间同源关系分析。而通过利用 MALDI-TOF MS 筛选出不同 ST 型别耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CR-KP)的特异质量峰,则可用于 CR-KP 的快速同源性分析,为暴发流行的监测和医院感染的控制提供依据^[14]。但是,有研究认为目前 MALDI-TOF MS 与一些经典的同源性分析方法,如 PFGE、MLST 等相比,在判断 CR-KP 的同源性及数

据一致性方面还有不小的差距^[15]。

WGS 技术已经开始作为一种常见的分子生物学技术应用于临床微生物研究当中。在临床微生物实验室中分离的各类多重耐药及泛耐药菌株,通过 WGS 可以快速获得丰富的分子生物学及分子流行病学信息,如血清学分型、MLST、耐药基因及毒力因子等等^[16]。此外,通过输入 WGS 测序结果,搜索 MLST 网站(<https://pubmlst.org/>)后,可以自动提取等位基因谱并呈现序列类型(STs)。本研究通过对 7 株恶臭假单胞菌进行 WGS 分析,发现 7 株恶臭假单胞菌均为 MLST-128 型,且他们的 ANI>99.9%。ANI 是在核苷酸水平上比较两个基因组之间的遗传关系的指标。ANI 被定义为两个微生物基因组同源片段之间平均的碱基相似度,其特点为在近缘物种之间有较高的区分度。由此测序结果可以看出,7 株恶臭假单胞菌亲缘关系近,为同一菌株来源。

本研究中,通过 MALDI-TOF MS 科研库发现该次收集的新生儿血流感染的 7 株恶臭假单胞菌同源的可能性在 80%~90%之间;同时,通过 WGS 测序分析验证了该结果的可靠性。虽然 WGS 在细菌新耐药基因的发现、细菌同源性分析方面有无与伦比的优势,但因其费用较高,且测序前样本的处理要求高,培养、提取菌株 DNA 耗时长,缺乏统一、快速、有效及大容量的生物信息学数据处理分析系统等因素,都阻碍了这一技术在临床的广泛应用^[17]。而 MALDI-TOF MS 这一技术目前已经广泛应用于临床,主要使用他的临床库进行细菌的快速鉴定;本研究利用 MALDI-TOF MS 科研库发现其可以对恶臭假单胞菌进行初步、快速的同源性分析,为阻止该菌在医院的暴发流行提供及时的实验室依据。本研究收集的样本量不大,因此有必要在后续研究中扩大样本量。相信随着研究的进一步深入,MALDI-TOF MS 在医院感染控制工作中发挥越来越大的作用。

参考文献

- [1] Mulet M, García-Valdés E, Lalucat J. Phylogenetic affiliation of *Pseudomonas putida* biovar A and B strains[J]. Res microbiol, 2013, 164(4):351-359.
- [2] Fernández M, Porcel M, de la Torre J, et al. Analysis of the pathogenic potential of nosocomial *Pseudomonas putida* strains [J]. Front Microbiol, 2015, 6:871.
- [3] CH Yang, T Young, MY Peng, et al. Clinical spectrum of *Pseudomonas putida* infection[J]. Formos Med Assoc, 1996, 95(10):754-761.

- [4] Carpenter RJ, Hartzell JD, Forsberg JA, et al. *Pseudomonas putida* war wound infection in a US Marine: a case report and review of the literature[J]. J Infect, 2008, 56(4):234-240.
- [5] Kim SE, Park SH, Park HB, et al. Nosocomial *Pseudomonas putida* bacteremia: high rates of carbapenem resistance and mortality[J]. Chonnam Med J, 2012, 48(2):91-95.
- [6] Thomas BS, Okamoto K, Bankowski MJ, et al. A lethal case of *Pseudomonas putida* bacteremia due to soft tissue infection[J]. Infect Dis Clin Pract, 2013, 21(3):147-213.
- [7] Basso P, Wallet P, Elsen S, et al. Multiple *Pseudomonas species* secrete exolysin-like toxins and provoke caspase-1-dependent macrophage death[J]. Environ Microbiol, 2017, 19(10):4045-4064.
- [8] Molina L, Udaondo Z, Duque E, et al. Specific gene loci of clinical *Pseudomonas putida* isolates[J]. PLoS One, 2016, 11(1):1.
- [9] Silke P, Philipp O, Leonard S, et al. Genomic characterisation of clinical and environmental *Pseudomonas putida* group strains and determination of their role in the transfer of antimicrobial resistance genes to *Pseudomonas aeruginosa* [J]. BMC Genomics, 2017, 18(1):859.
- [10] Tran QT, Nawaz MS, Deck J, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas putida* isolates from imported shrimp[J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(5):1885-1887.
- [11] 刘健龙, 郭宽鹏, 李先斌, 等. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱在鉴定儿童血流感染少见苍白杆菌的应用及耐药情况分析[J]. 实用预防医学, 2021, 28(7):818-821.
- [12] J Rödel, Mellmann A, Stein C, et al. Use of MALDI-TOF mass spectrometry to detect nosocomial outbreaks of *Serratia marcescens* and *Citrobacter freundii*[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2019, 38(3):581-591.
- [13] 李鑫, 赵强, 叶丽艳, 等. MALDI-TOF MS 用于碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌同源分析的应用评价[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(6):435-439.
- [14] 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的快速分型[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(3):206-212.
- [15] Jiang F, Kong Z, Cheng C, et al. Overestimated discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones [J]. Epidemiol Infect, 2019, 147:e324.
- [16] 高敏, 杨婷婷, 李桂莲, 等. 基于全基因组测序的我国耐多药结核分枝杆菌耐药突变特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(5):770-775.
- [17] 林豪芸, 梁训宏, 胡珍, 等. 基于全基因组测序技术分析深圳市人民医院 2008—2016 年碳青霉烯类耐药大肠埃希菌的耐药基因及分子流行病学特征[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(11):1086-1092.

收稿日期:2022-03-06