

2种检测方法对纹带棒状杆菌同源性研究进展

李梦薇 罗国兰 韦柳华* 综述

广西柳州市工人医院医学检验科 广西柳州 545005

摘要: 目前细菌同源性研究的参考方法为PFGE(脉冲场凝胶电泳),常应用于细菌的同源性研究。纹带棒状杆菌引起的院内感染因其隐蔽性常被临床忽视,PFGE用于同源性分析对于细菌引起的医院感染暴发的溯源是相当滞后的,只能用于回顾性研究分析。相较于PFGE,MALDI-TOF MS(基质辅助激光解析电离飞行时间质谱)优在实时性、快速、简便、高通量、低成本,通过MALDI-TOF MS对纹带棒状杆菌在同源性分析上的应用,依托于MALDI-TOF MS系统自带的强大的聚类分析软件,能快速地统计、分析疑似感染病例检出菌及其周边环境采样株的同源性,追踪其传染源、感染途径,以利于临床能够最快速、及时、准确地采取相关措施控制传染源,并切断传播途径,为临床采取隔离、治疗等措施争取时间,建立起一整套针对纹带棒状杆菌及相关细菌引发院内细菌感染暴发的实时监控体系。

关键词: 纹带棒状杆菌; MALDI-TOF MS; 脉冲场凝胶电泳; 同源性研究

一、同源性概述

同源性是指在进化过程中源于同一祖先的分支之间的关系,包括直系同源和旁系同源。直系同源基因描述在不同物种中来自于共同祖先的基因,而旁系同源基因描述在同一物种内由于基因复制而分离的同源基因。

二、PFGE与MALDI-TOF MS在同源性研究上的背景分析

同源性研究传统理论主要依赖于分子生物学技术,比如PFGE。传统的微生物检测手段包括各类细菌、真菌的鉴定和同源性分析通常是建立在形态学、细胞生理和生物化学水平^[1],所以一直存在操作繁琐、周期性长、时效性差的缺点,不如血液各项指标检测手段快捷、高通量、自动化程度高,人类一直在致力于研究一种新型的鉴定手段可以摒弃传统的形态、细胞、生化反应等细菌鉴定理念,可以另辟蹊径研究细菌,如果从蛋白水平分析研究,可以完美地避开细菌、真菌生长所需要的培养时间、培养条件,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)应运而生。它是一种新型的软电

基金项目:《应用MALDI-TOF MS和脉冲场凝胶电泳对纹带棒状杆菌的同源性研究》,广西壮族自治区卫健委自筹项目,编号:Z20200125

作者简介:李梦薇(1981-),女,汉族,广西柳州人,在职研究生学历,单位:广西柳州市工人医院,主攻耐药机制和耐药监测方向。

离质谱技术,近年来在全世界包括中国微生物领域得到了飞速的发展,得益于其高通量、快捷简便的优点^[2-4],其在微生物的鉴定、分型和同源性分析、耐药检测和药敏分析上的应用越来越广^[1]。

三、纹带棒状杆菌概述

纹带棒状杆菌在我们传统的观念里通常被定义为人类鼻咽部及皮肤表面的正常定植菌^[5-12],同时也被认为是一种条件致病菌,能够引起免疫功能低下的患者相关性感染^[13],但是纹带棒状杆菌作为呼吸道潜在的危险因素,通常很难去界定它是否与疾病直接相关,只有当其纯培养检出或检出占优势,并且重复检出才具有临床意义^[14]。

四、质谱技术的应用与纹带棒状杆菌的检出相关

随着质谱技术的逐步推广与应用,纹带棒状杆菌这一传统检测手段难以鉴定、导致我们容易忽视、漏检的革兰阳性杆菌逐步进入公众的视野,近年来国内外不断有报道显示棒状杆菌特别是纹带棒状杆菌在医院内具有强大的生存能力和传播能力,且多呈现多重耐药^[15],已有研究显示随着基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)的广泛应用,越来越多的纹带棒状杆菌自院内感染暴发相关患者及相关途径检出,特别是长期住院、长期应用广谱抗生素、使用侵入性医疗器械和存在器质性阻塞性病变的基础疾病患者检出,人们越来越意识到大大低估了纹带棒状杆菌作为定植菌或感染菌在临床标本中的真实流行情况,其在引起院内感染暴发

的潜在威胁不容忽视。

五、近50年间世界各地纹带棒状杆菌引起院内感染暴发实例

Giorgio SilvaSantana 等人发表的一篇对纹带棒状杆菌引起医院侵入性感染及院内感染暴发进行回顾性分析提示它越来越多地被认为是过去50年间潜在的病原体^[12]，自2000年以来它更多地是以世界各地相继报道的由此菌引起的院内感染暴发的而出现的：2004-2005年西班牙一家专门为严重慢性呼吸道疾病患者提供护理的二级医疗保健中心，从21名COPD住院患者标本分离出43株纹带棒状杆菌其中有一个月有8名患者检出11株纹带棒状杆菌，提示该菌院内感染暴发可能性^[16]；2006年Iaria等人报道的发生在意大利的13例颅脑多发骨折、脑出血与脑肿瘤转移转移住院患者疑似出现纹带棒状杆菌院内暴发^[12]；2009-2010年Baio等人报道的发生于巴西的由14例感染性疾病患者的气管抽吸物、支气管肺泡灌洗、脑脊液、血液和尿液同时检出纹带棒状杆菌疑似院内暴发感染^[12]；2011年比利时一家医院8个月时间内由住院患者检出的24株纹带棒状杆菌经PFGE、半自动重复序列PCR和MALDI-TOF MS进行同源性研究揭示了其与暴发相关的菌株同属一个单一类型^[17]；2013年Paulo Victor Pereira Baio等人报道的巴西里约热内卢由一例气管插管住院患者携带的多重耐药（MDR）纹带棒状杆菌引起的优势基因型院内暴发^[18]；Juliana Nunes, Ramos等人报道的巴西里约热内卢一家医院2009-2013年相继从血流和导管相关性感染患者血液及导管尖端标本分离出的23株纹带棒状杆菌PFGE分型显示其作为感染菌存在持久性及存在院内暴发可能^[19]；Iaria, C等人报道的意大利重症监护病房多重耐药纹带棒状杆菌院内暴发感染^[20]。综合以上报道分析可得出，长时间住院、慢性阻塞性肺部疾病、多种医疗器械的侵入性操作包括气管插管、呼吸机、导管留置、鼻饲等因素都有可能促进纹带棒状杆菌的定植，进而发生侵袭性感染，也有研究显示同一克隆株可以在住院患者之间平行传播、长期存在，这为它引起院内感染暴发提供了更大的可能性^[12, 16-20]。

六、纹带棒状杆菌传播的长期性与隐蔽性

国外已有研究证实，无症状定植患者是纹带棒状杆菌的主要定植宿主，医护人员则作为纹带棒状杆菌在患者之间交叉传播的载体，再通过手在患者之间传播。纹带棒状杆菌是长期住院患者的医院病原体，可能是重大疫情的起源，其引起感染暴发是长期的、隐蔽的，不容

易察觉的^[17]，因此纹带棒状杆菌的同源性分析对于院内感染暴发监测的重要性是不言而喻的。

七、细菌分型方法概述

通常基因水平的细菌分型聚类分析方法，例如PFGE、POT、多位点序列分型、SPA分型和SCCmec分型等，这些方法具有较高的识别精度；然而，由于其程序复杂、成本高，常规使用是不切实际的。基于药物敏感性试验模式的分型方法简单，但是准确性有限，与基于基因分析的分型方法相关性较低^[21-24]。

八、PFGE细菌分型原理与性能评价

PFGE对细菌进行同源性分析的原理基于分析细菌染色体DNA的差异，作为同源性分析的金标准，其重复性好、分辨率高、结果稳定、易于标准化，在细菌分子流行病学研究中占据重要地位。PFGE可以直接或间接反映病原体变异分化的本质（即DNA序列的改变），它对细菌的全部基因组DNA进行消化切割，切割后的DNA分子带有负电荷，在脉冲场凝胶电泳中朝正极移动，相对较小的分子在电场转换后可以较快转变移动方向，而较大的分子在凝胶中转向较为困难。因此小分子向前移动的速度比大分子快，从而在凝胶上按染色体大小而呈现出不同的电泳带型，DNA条带的密度则反映了细菌内DNA含量与分子大小，然后根据获得的酶切图谱条带数量与大小的差异性来判读是否具有同源性^[25, 26]。脉冲场凝胶电泳可以用来分离大小从10kb到10Mb的DNA分子。PFGE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，并且有成熟分型结果数据库，PFGE被国内外分子流行病学者广泛认同，被认为是病原菌分子生物分型的“金标准”方法^[25, 27]。但其有着最大的不足就是滞后性，由于其耗时长、步骤繁琐，常应用于医院感染暴发后的回顾性分析，一直以来多应用于科研性的回顾性分析，临床应用很少^[28-30]，而且如若发生院内感染在疫情暴发期间无法实现实时监控细菌传染源及感染途径。

九、MALDI-TOF MS细菌分型原理与性能评价

MALDI-TOF MS作为微生物识别的一种新型工具，它通过识别细菌细胞中大量存在的核糖体相关蛋白的特征峰来用于分析，据报道基于质谱的分析也可以实现亚种水平的鉴定，这在其他技术很难实现，比如16S rRNA测序，这表明质谱分析对细菌种类进行能够更详细的分类可能^[31]。其在同源性研究方面的优势是突出的、广泛的，覆盖院内感染的大部分常见菌种。微生物由其自身

独特的蛋白质组成，蛋白质约占细菌干重的50%，其表达由遗传性状决定，受外界环境影响较小，具有多样性、丰富性、易于提取和分离且不需要扩增的特点，因此成为目前MALDI-TOF MS技术检测病原菌的最主要生物标志^[1]。MALDI-TOF MS基本工作原理是MALDI-TOF MS的离子源通过激光轰击待测样品与基质形成的共结晶薄膜，使基质从中吸收能量并传递给生物分子，二者间发生质子（即电荷）转移而使生物分子电离。电离的生物分子在电场作用下加速通过飞行管道，根据到达检测器的时间及离子的数量得到质/荷（m/z）比值及信号值而形成相应的峰图。然后通过比对，MALDI-TOF MS获得种属间的特异峰图（主要由核糖体蛋白形成，m/z范围为2000~20000），再与数据库中的参考谱图比对，从而鉴定细菌至属、种，乃至亚种的水平^[32]。在实验室发现可疑暴发感染菌株时，可在细菌获得蛋白指纹图谱后通过MALDI-TOF MS自带的聚类分析软件进行聚类和主成分分析，分析其亲缘关系远近，最快可在几分钟内判断检出菌是否为同源克隆菌株，判断出发生院内细菌感染暴发的潜在威胁，实时监控传染源、传播途径，从而指导临床采取相应措施以防止暴发进一步扩大^[28-30]。MALDI-TOF MS最大的优点在于其优越的实时性^[1, 28-30]。已有越来越多的研究结果显示MALDI-TOF MS对细菌同源性的分析的准确度可与PFGE（脉冲场凝胶电泳）相媲美^[25-30, 31, 33]。

十、世界各地MALDI-TOF MS应用于纹带棒状杆菌源性研究实例

Adrian Egli等人研究发现MALDI-TOF MS可以作为产超光谱产β-内酰胺酶的大肠杆菌的实时疫情调查工具^[34]；Valerie等人提出通过MALDI-TOF MS得出的500至10000 m/z之间的特征峰从多株金黄色葡萄球菌分离株中识别MRSA（耐甲氧西林葡萄球菌）的可能性^[35]；Wolters等人选取了金黄色葡萄球菌MALDI-TOF MS得出的13个特征峰进行聚类分析，成功地将其分为5个亚群^[36]；P. BERNASCH等人调查研究发现，在肺炎克雷伯菌院内感染暴发期间收集的相关易感株同时用3种方法（MALDI-TOF MS、PFGE、rep-PCR）进行源性分析，所得结果一致，提示MALDI-TOF-MS蛋白质组分分析可能提供在医院爆发调查期间一个快速和有价值的初步筛选工具^[37]；Antonella Mencacci等人的研究表明，MALDI-TOF MS与基于重复序列的PCR-DiversiLab系统可以同时用于监测多重耐药鲍曼不动杆菌医院内暴发，MALDI-TOF MS可以在基于DNA结果得出之前用于实时

检测不动杆菌爆发^[38]。

十一、总结-MALDI-TOF MS与PFGE在纹带棒状杆菌源性应用中各有所长，MALDI-TOF MS用于源性研究更容易普及到各基层临床科室

随着MALDI-TOF MS的广泛应用，越来越多的纹带棒状杆菌被检出，其成为条件致病菌的观念也越来越多地得到各专家的共识^[39-40]。住院时间的延长、慢性阻塞性肺疾病晚期、近期抗生素的使用和接触侵入性诊断操作是引起患者纹带棒状杆菌定植和感染最常见的危险因素。纹状棒状杆菌是长期住院患者的一种机会性医院病原体，可能是主要暴发的来源。常规使用MALDI-TOF MS极大地促进了临床样本中纹带棒状杆菌的识别/鉴定，该技术也可作为一种简单、快速的流行病学分型工具用于院感暴发疫情的调查^[17, 41]。PFGE作为一种传统的细菌流行病学分型工具，其重复性好、分辨率高、结果稳定、易于标准化的优点是毋庸置疑的，但是其滞后性在临床院感暴发监测的不实用性也日渐凸显出来，具有快速、高通量优点的新型软电离技术MALDI-TOF MS就是对其在源性领域短板一个最好的补充，在实时监控纹带棒状杆菌院内感染暴发的应用方面也更容易普及到基层临床科室。

参考文献

- [1] 曹艳, 黄一灵, 徐艳玲, 等. MALDI-TOF MS技术在临床微生物检验领域的应用进展分析[J]. 临床与病理杂志, 2015, 35(1): 123-127
- [2] 徐志江, 周宏伟, 孙谦, 等. 用MALDI-TOF MS技术快速鉴定临床分离棒状杆菌属细菌[J]. 临床检验技术研究, 2012, 9(3): 668-670
- [3] 杨伟玮, 汪燕, 孙传强. 数据处理和分析方法在MALDI-TOF MS鉴定微生物中的应用[J]. 中国微生物学杂志, 2018, 30(3): 368-372
- [4] 王亚南, 高晶晶, 钟桥, 等. MALDI-TOF MS技术在鲍曼不动杆菌鉴定及源性分析中的应用[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(6): 430-433
- [5] Soriano, F, J. L. Rodr'iguez-Tudela, R. Fern'andez-Roblas, et al. Skin colonization by Corynebacterium groups D2 and JK in hospitalized patients[J]. J. Clin. Microbiol, 1988, 26(9): 1878 - 1880.
- [6] von Graevenitz, A, V. P'untner-Streit, P. Riegel, and G. Funke. Coryneform bacteria in throat cultures of healthy

individuals[J].J.Clin. Microbiol,1998,36(7):2087 - 2088.

[7]Melero-Bascones,M,P.Mun˜oz,M.Rodríguez-Creixems,et,al.Corynebacterium striatum: an undescribed agent of pacemaker-related endocarditis[J].Clin.Infect.Dis.1996,22(3):576 - 577.

[8]Prada,JL,Villanueva,JL,Torre-Cisneros,J, et,al. Endocarditis caused by non-diphtheriae Corynebacterium. Presentation of 12 cases and review[J].Enferm. Infecc. Microbiol. Clin,1993,11(10):536 - 542.

[9]Rufael,D.W,and S.E.Cohn.Native valve endocarditis due to Corynebacterium striatum: case report and review[J]. Clin.Infect.Dis,1994,19(6):1054 - 1061.

[10]Tumbarello,M,Tacconelli,E,del Forno,A, et,al. Corynebacterium striatum bacteremia in patient with AIDS[J]. Clin.Infect.Dis.1994,18(6):1007 - 1008.

[11]Watkins,D.A,Chahine,A,Creger,R,J,et,al. Corynebacterium striatum: a diphtheroid with pathogenic potential[J].Clin. Infect. Dis,1993,17(1):21 - 25.

[12]Silva-Santana G,Silva CMF,Olivella JGB,et,al. Olivella,JGB,et al.Worldwide survey of Corynebacterium striatum increasingly associated with human invasive infections, nosocomial outbreak, and antimicrobial multidrug-resistance, 1976-2020[J].Arch Microbiol.2021,203(5):1863-1880

[13]王丽丹,徐新艳,赵水娣,等.痰液纹带棒状杆菌的分离与鉴定[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(8):221-224

[14]Riegel, P.Bacteriological and clinical aspects of corynebacterium.ANN BIOL CLIN-PARIS[J].1998,56(3):285 - 296.

[15]邓洪均.住院患者分离的纹带棒状杆菌耐药性及同源性研究[J].检验医学与临床,2015,12(18):2741-2745

[16]Renom,F,Garau,M,Rubí,M,et,al.Nosocomial outbreak of Corynebacterium striatum infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J].J Clin Microbiol.2007,45(6):2064-2067

[17]Verroken C,Bauraing A,Deplano A,et,al. Epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant Corynebacterium striatum at one Belgian university hospital[J].Glupczynski, YClin Microbiol

Infect.2014,20(1):44-50

[18]Paulo Victor Pereira Baio, Higor Franceschi Mota, André a D' avila Freitas, et al.Clonal multidrug-resistant Corynebacterium striatum within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil [J].Mem Inst Oswaldo Cruz.2013,108(1):23-9

[19]Juliana Nunes Ramos1,Cassius Souza1,Yuri Vieira Faria1,et,al.Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of multidrug-resistant and biofilm producer Corynebacterium striatum[J]. BMC Infect Dis.2019,19(1):672

[20]Iaria C,Stassi G,Costa GB,et,al.Outbreak of multi-resistant Corynebacterium striatum infection in an Italian general intensive care unit[J].J Hosp Infect.2007,67(1):102-4

[21]Healy M, Huong J, Bittner T, et,al. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR[J]. J Clin Microbiol,2005,43(1):199-207.

[22]Moriyama H, Matsuda C, Shibata H, et,al. Usefulness of phage ORF typing, a rapid genotyping method as a molecular and epidemiological method for detecting meticillin resistant Staphylococcus aureus[J].Kansenshogaku Zasshi 2012,86(2):115-120 .

[23]Suzuki M. Principle of Cica Geneus Staph POT kit and molecular epidemiology of meticillin-resistant Staphylococcus aureus[J]. Chem Times 2011 (3):16-21.

[24]Sato S,Saito Y,Sato H,et,al.Relationship between antimicrobial susceptibility cluster analysis and pulsed-field gel electrophoresis patterns of meticillin-resistant Staphylococcus aureus[J].J Med Technol 2008,(57):229-235.

[25]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):27-31

[26]王晔茹.基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱在食源性致病菌检测和鉴定分型中的应用研究[D].北京:中国疾病预防控制中心,2008:7-10.

[27]Souza AV, Moreira CR, Pasternak J, et al. Characterizing uncommon burkholderia cepacia complex isolates from an outbreak in a haemodialysis unit[J]. Journal of Medical Microbiology, 2004,53(10):999-1005.

[28]Antonella Mencacci, Claudia Monari, Christian Leli,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

[29] Bernaschi P, Del Chierico F, Petrucca A, et al. Microbial tracking of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hospital setting[J]. Int Immunopathol Pharmacol. 2013,26(2):463-472.

[30] Michaele Josten, Marion Reif, Christiane Szekat, 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.

[31] O. Ueda, S. Tanaka, Z. Nagasawa, et al. Development of a novel matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrum (MALDI-TOF-MS)-based typing method to identify *Staphylococcus aureus* clones[J]. The Journal of hospital infection. 2015,90(2): 147-155

[32] Doern CD. Integration of technology into clinical practice[J]. Clin Lab Med, 2013, 33(3): 705-729

[33] 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, 2019, 39(1): 62-66

[34] Adrian Egli, Sarah Tschudin-Sutter, Michael Oberle, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Typing of Extended-Spectrum β -Lactamase Producing *E. coli*-A Novel Tool for Real-Time Outbreak

Investigation[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0120624

[35] Valerie EJ, Claydon MA, Evason DJ, et al. Rapid discrimination between *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry[J]. J Med Microbiol 2000, 49(3): 295-300.

[36] Wolters M, Rohde H, Maier T, et al. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major *Staphylococcus aureus* lineages[J]. J Med Microbiol 2011, 301(1): 64-68.

[37] 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

[38] Antonella Mencacci, Claudia Monari, Christian Leli, 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): 603-6

[39] 李科, 张德纯, 张名均, 等. 多药耐药纹带棒杆菌的重复序列PCR分型与耐药机制的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(5): 965-977

[40] Datta, P, Gupta, V, Gupta, M, Chander, J. *Corynebacterium Striatum*, an Emerging Nosocomial Pathogen: Case Reports[J]. Infect Disord Drug Targets, 2021 21(2): 3013-303

[41] 屠博文, 史伟峰, 韩晓冬, 等. MALDI-TOF质谱在院内感染致病菌检测中的应用[J]. 重庆医学, 2015, 44(33): 4665-4670