

# 飞行时间质谱技术在肠炎沙门菌快速鉴定及同源性分析中的应用

侯柏龙<sup>1</sup>, 王蔚<sup>1</sup>, 高雯洁<sup>2</sup>

(1. 嘉兴市第一医院检验科, 浙江 嘉兴 314000;

2. 嘉兴市疾病预防控制中心, 浙江 嘉兴 314000)

**摘要:**目的 研究基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)在肠炎沙门菌快速鉴定及同源性分析中的应用效果。方法 对2018年8月~12月嘉兴市第一医院患者大便标本分离出的11株肠炎沙门菌采用MALDI-TOF MS进行鉴定及同源性分析,并与VITEK-2 Compact仪鉴定结果和脉冲场凝胶电泳分型(PFGE)聚类分析结果进行比较。结果 收集得到的11株菌株经VITEK 2 Compact全自动微生物分析仪鉴定为沙门菌属历时约228 min,而MALDI-TOF MS鉴定只需8 min,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。MALDI-TOF MS在聚类相似度为80%时,可以将11株肠炎沙门菌分为2型(MS1型和MS2型),其中MS1型为主要的质谱型,占90.91%。而PFGE在相似度 $>95\%$ 时,也可以将11株肠炎沙门菌分为2型(E1型和E2型),两种方法分型结果相似度为73%,并不完全相同。结论 MALDI-TOF MS技术用于鉴定肠炎沙门菌,结果快速可靠,血清分型则需借助血清凝集试验。MALDI-TOF MS技术对肠炎沙门菌同源性分析结果与PFGE技术相似度为73%,可以作为肠炎沙门菌同源性分析方法的参考,为疾病防治以及疫情防控提供宝贵的时间差。

**关键词:** MALDI-TOF MS; PFGE; 肠炎沙门菌; 同源性分析

中图分类号: R44

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2021.09.048

文章编号: 1006-1959(2021)09-0176-03

## Application of Time-of-flight Mass Spectrometry in Rapid Identification and Homology Analysis of Salmonella Enteritidis

HOU Bai-long<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, GAO Wen-jie<sup>2</sup>

(1. Clinical Laboratory, The First Hospital of Jiaxing City, Jiaxing 314000, Zhejiang, China;

2. Jiaxing Center for Disease Control and Prevention, Jiaxing 314000, Zhejiang, China)

**Abstract:** Objective To study the application effect of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in the rapid identification and homology analysis of Salmonella enteritidis. Methods The 11 strains of Salmonella enteritidis isolated from stool specimens of patients in the First Hospital of Jiaxing City from August to December 2018 were identified and analyzed by MALDI-TOF MS and compared with the identification results of VITEK-2 Compact instrument and the cluster analysis results of pulse field gel electrophoresis (PFGE). Results The collected 11 strains were identified as Salmonella by the VITEK 2 Compact automatic microbial analyzer, which lasted about 228 minutes, while the MALDI-TOF MS identification only took 8 min, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). When the cluster similarity of MALDI-TOF MS was 80%, 11 Salmonella enteritidis can be divided into 2 types (MS1 and MS2). Among them, MS1 was the main mass spectrometer, accounting for 90.91%. When PFGE had a similarity greater than 95%, 11 Salmonella enteritidis can also be divided into 2 types (E1 and E2). The similarity of the typing results of the two methods was 73%, which was not exactly the same. Conclusion MALDI-TOF MS technology is used to identify Salmonella enteritidis, and the results are fast and reliable. Serum agglutination test is needed for serotyping. The homology analysis results of MALDI-TOF MS technology for Salmonella enteritidis and PFGE technology are 73% similar, which can be used as a reference for the homology analysis method of Salmonella enteritidis, providing a valuable time difference for disease prevention and epidemic prevention and control.

**Key words:** MALDI-TOF MS; PFGE; Salmonella enteritidis; Homology analysis

肠炎沙门菌(*Salmonella enteritidis*)是目前引起食物中毒的主要病原菌之一<sup>[1]</sup>,人类感染肠炎沙门菌后常出现腹泻、呕吐等典型急性肠胃炎症状,少数人出现发热。动物对该菌也同样易感,尤其是被感染的家禽及其制成的家禽制品,由于它们携带肠炎沙门菌被人类食用而损害人类健康,甚至造成疫情暴发。对肠炎沙门菌进行同源性分析,可以追溯传染源,及时采取措施控制疫情以及预防感染,同时为流行病学研究、食品安全、健康管理方面提供可靠的依据。脉冲场凝胶电泳(plused-field gel electrophoresis, PFGE)是目前国内外普遍应用于细菌分子分型的一

种电泳技术,被誉为菌株同源性分析的金标准<sup>[2]</sup>,然而PFGE方法比较繁琐、耗时长、需要各实验室间协调参数进行比较。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)技术作为一种新型的电离质谱技术,近年来发展快速并应用于微生物的快速鉴定,其处理过程简便快速,仪器自动化程度高,可以实现96孔高通量分析,单次成本较低<sup>[3]</sup>,但是目前运用于菌株同源性分析研究的还较少。基于此,本研究运用PFGE与MALDI-TOF MS两种技术分别对11株从临床分离得到的肠炎沙门菌进行同源性分析,将两种技术及其分析后的结果进行比较,进而分析其应用价值,以期对疾病防治以及疫情防控提供科学依据,现报道如下。

基金项目:嘉兴市科技计划项目(编号:2018AD32072)

作者简介:侯柏龙(1988-),女,山西阳城县人,硕士,主管技师,主要从事微生物检验工作和细菌耐药性机制研究

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集嘉兴市第一医院 2018 年 8 月~12 月患者的肠道标本分离培养沙门氏菌。质控菌株:大肠埃希菌 ATCC8739 由法国梅里埃公司惠赠,分子质量参考菌株:沙门氏菌国际标准菌株 H9812,由浙江省疾病预防控制中心提供。

1.1.2 试剂与仪器 乙腈; $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸基质液 CHCA;血平板(法国梅里埃);木糖赖氨酸去氧胆酸钠琼脂平板(XLD)、改良磺绿增菌液(SBG)(上海科玛嘉微生物技术有限公司),沙门属 60 种诊断血清(宁波天润生物药业有限公司),细菌基因组 DNA 提取试剂盒;内切酶 Xba I (美国 Promega)、蛋白酶 K (德国 MERCK),PFGE 专用琼脂糖 SeaKem Gold Agarose(美国 Lonza)。CHEF Mapper 脉冲场凝胶电泳仪和 GEL Doc EQ 凝胶成像分析系统(美国 DADE BEHRING);VITEK MALDI-TOF MS 及 VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定仪均购自法国梅里埃公司;力康 Heal Force 生物安全柜 HF safe 1500TE B2II(中国力康);低温冰箱(Haier,中国海尔)。

### 1.2 方法

1.2.1 菌株复苏及鉴定 将收集的 11 株菌株复苏,涂血平板后于 37℃培养 24 h,分别调 0.5 麦氏浊度,采用 VITEK-2 Compact 仪器配套 GN16 卡进行生化鉴定,并采用沙门菌属诊断血清进行确认分型。

1.2.2 MALDI-TOF MS 菌种鉴定 采用 MALDI-TOF MS SARAMIS 系统对上述菌株进行鉴定:①靶板清洗:用乙醇清洗靶板后待用;②点样:在生物安全柜内取经 18~24 h 培养菌落少量均匀涂于靶板,每个菌株涂 1 孔,完全干燥后加 CHCA 基质液 1  $\mu$ l,待基质液干燥后移出生物安全柜进行质谱检测。采用正线性模式,激光频率 60 Hz,加速电压 20 KV,离子源加速电压 167 KV、170 ns 离子延时引出,质谱区间设定的质核比(M/Z)为 2000~20000 Da,质控品为大肠埃希菌 ATCC8739,采用 VITEK MALDI-TOF MS IVD3.0 版本进行结果比对,检测结果以成功鉴定为沙门氏菌即可满足要求。

1.2.3 MALDI-TOF MS 分型与质谱图的分析比较 在 SARAMIS 数据库界面,导入需进行同源性分析的 11 株菌,Lanchpad 软件导出属于同一型的肠炎沙门菌的质谱图,进行同源性分析,并形成同源性图谱。

1.2.4 PFGE 分型 根据沙门氏菌脉冲场凝胶电泳标准操作规程进行:①细菌的包埋;②细菌的裂解;③清洗胶块;④胶块内 DNA 的酶切;⑤加样和电泳;⑥图像获取;⑦数据分析。用 Xba 1 内切酶在 37℃下酶切 4 h,然后上机电泳,分子量 30~700 K,初始转换时

间 2.16 s,终末转换时间 63.8 s,电压梯度 6 V/cm,夹角 120°,线性,电泳起始电流 140 mA。

1.3 统计学方法 将获得的 11 株肠炎沙门菌的 PFGE 图谱用 BioNumerics 6.6 软件分析,并使用非加权配对算术平均法进行聚类分析,以  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 菌株鉴定结果 收集得到的 11 株菌株经法国生物梅里埃公司 VITEK 2compact 全自动微生物分析仪鉴定为沙门菌属历时约 228 min,而 MALDI-TOF MS 鉴定只需 8 min,二者比较,差异统计学意义( $P<0.05$ ),且鉴定结果全部正确,见图 1。血清凝集试验结果:A~F 多价 O 抗血清:(+),O 因子 O1:(+),O9:(+),O12:(+),H 因子 Hg:(+),Hm:(+),盐水对照:(-)符合肠炎沙门菌血清型。

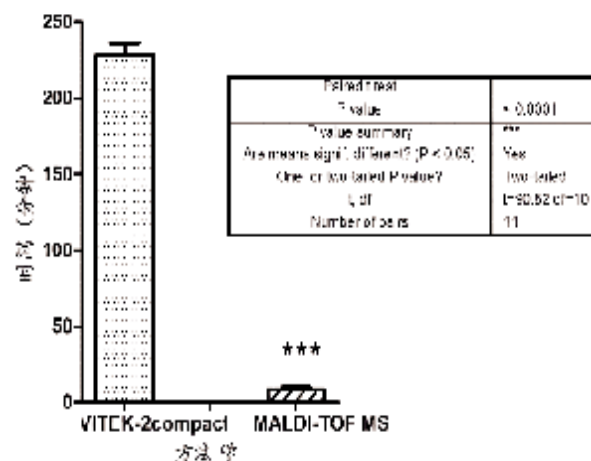


图 1 两种方法鉴定肠炎沙门菌时间比较

## 2.2 菌株分型结果

2.2.1 MALDI-TOF MS 分型结果 以相对相似度>80%为同一型的分型方法,MALDI-TOF MS 分型共分为 MS1 型与 MS2 型,其中 MS1 型占 90.91%(10/11)、MS2 型占 9.09%(1/11),分型集中于 MS1,见图 2。

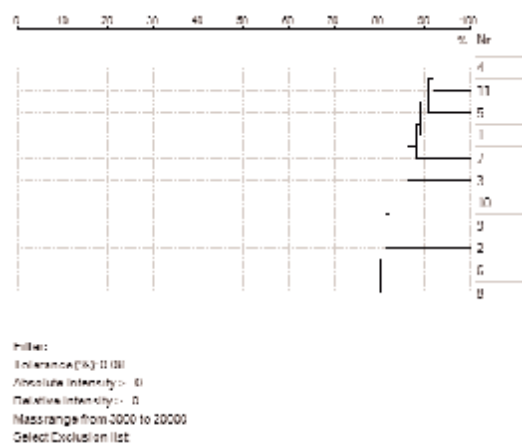


图 2 11 株肠炎沙门菌 MALDI-TOF MS 分型结果

**2.2.2 PFGE 分型结果** 11株肠炎沙门菌经酶切处理后上机电泳,得到 PFGE 图谱进行同源性分析,结果显示菌株相似度在 93%~100%。根据聚类相似度>95%为同一亚型的分型标准,可以将 11 株菌株分为 E1 型和 E2 型,其中 E1 型占 81.82%(9/11),E2 型占 18.18%(2/11),分型集中于 E1 型,见图 3。

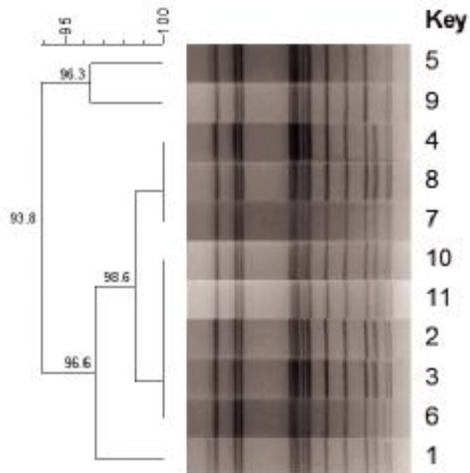


图3 11株肠炎沙门菌 PFGE 分型结果

### 3 讨论

沙门氏菌是一类寄居于人类或动物肠道内的革兰阴性杆菌,在自然界中常见,主要引起人类伤寒、副伤寒、急性肠胃炎、败血症、局部感染等疾病,其中肠炎沙门氏菌主要引起人类食物中毒<sup>[4]</sup>。而我国引起食物中毒的原因中尤以细菌性食物中毒高发,占各种食物中毒类型的 34.84%<sup>[5]</sup>,因此,快速准确地鉴定沙门氏菌并明确其分型对临床诊疗和感染预防均有重要意义。

研究表明<sup>[6]</sup>,MALDI-TOF MS 鉴定可信度达>80%,结果较为准确。本研究中利用 MALDI-TOF MS 与微生物自动生化鉴定系统 VITEK 2 分别检测 11 株肠炎沙门菌,两者得到的检测结果完全一致,MALDI-TOF MS 检测所需的时间仅为 VITEK 2 的 1/29,而且对于 MAC 平板、SS 平板和 HE 平板等常用的选择性培养基上生长的沙门菌菌株,MALDI-TOF MS 均能得到准确的鉴定结果。细菌同源性分析有助于疾病预防部门系统地开展溯源分析及分子流行病学研究,而 PFGE 是目前实现这一目标的可靠方法,但其实验繁琐、耗时长,临床难以常规开展。本研究选取了 11 株从临床患者大便标本分离得到的肠炎沙门菌,利用 MALDI-TOF MS 得到分型结果进行聚类分析,然后与“金标准”的 PFGE 分型结果相比较,结果发现两者分型结果相似度达 73%,提示 MALDI-TOF MS 用于肠炎沙门菌同源性分析仅可以做参考,准确结果目前仍需要借助 PFGE 技术来得到。但有研究显示<sup>[7]</sup>,MALDI-TOF MS 可对肺炎克雷伯菌进行同源性分析,结果可靠。有研究显示<sup>[8]</sup>,该技术运用于鲍曼不动

杆菌、鼠伤寒沙门菌等的同源性分析时同样具有快速、高通量的优点。另有研究表明<sup>[9]</sup>,将临床菌株质谱数据补充至质谱仪鉴定数据库,可以增加 MALDI-TOF MS 对沙门菌的分型鉴定能力。本研究中 MALDI-TOF MS 对 11 株肠炎沙门氏菌同源性分析结果与 PFGE 有差异,可能与本实验所用的菌株数量过少出现偶然性有关,需要进一步丰富采集的肠炎沙门菌数量进行实验;也可能是由于血清学方法是根据细菌的抗原差异来区分类型,而 MALDI-TOF MS 是通过检测细菌菌体核糖体蛋白质来区分类型,同一种菌株的不同菌体之间表面的组成分布不完全相同,因为细菌的遗传状态、基质选择、培养条件及抗生素使用所导致耐药谱的不同均会影响菌株的蛋白表达,进而造成分型确定的不稳定性<sup>[9]</sup>。

综上所述,MALDI-TOF MS 技术用于快速鉴定沙门氏菌,结果可靠。MALDI-TOF MS 技术可以作为肠炎沙门菌同源性分析方法的参考,为疾病防治以及疫情防控提供宝贵的时间差。但暂时还不能完全代替 PFGE 方法作为同源性分析的金标准,日后将增加实验菌株数目继续实验以及进一步完善 MALDI-TOF MS 比对数据库。

### 参考文献:

- [1]李颖,张爽,王彦波,等.2014-2017 年北京市顺义区腹泻病例中沙门菌流行特征与分子分型特征分析[J].疾病监测,2018,33(10):803-808.
- [2]阮伟伟,张勤勤,黄智瑜,等.应用脉冲场凝胶电泳技术对肠炎沙门菌食物中毒的溯源分析[J].中国食品卫生杂志,2018,30(5):543-546.
- [3]梁达炜,梁权辉,方艳平,等.基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱快速鉴定沙门菌临床分离株[J].中国人兽共患病学报,2016,32(7):600-603.
- [4]Bottichio L,Medus C,Sorenson A,et al.Outbreak of Salmonella oslo infections linked to persian cucumbers-United States,2016 [J].MMWR Morb Mortal Wkly Rep,2016,65 (50-51):1430-1433.
- [5]王氏,张晓芳,于瑞敏,等.2000-2015 年全国食物中毒通报情况分析[J].医学动物防制,2018,34(7):644-647.
- [6]Febbraro F,Rodio DM,Puggioni G,et al.Maldi-tof ms versus vitek 2:Comparison of systems for the identification of microorganisms responsible for bacteremia[J].Curr Microbiol,2016,73(6):843-850.
- [7]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.
- [8]程招敏,蓝锴,柏彩英,等.基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱在鼠伤寒沙门菌 I 司源性分析中的应用价值[J].蚌埠医学院学报,2016,41(4):426-430.
- [9]郑秋月,战晓微,肖珊珊,等.沙门氏菌 MALDI-TOF MS 分型方法建立[J].中国公共卫生,2014,30(10):1344-1347.

收稿日期:2020-10-29;修回日期:2020-11-08

编辑/王海静