

DOI: 10.3969/j.issn.1005- 8982.2017.09.014

文章编号: 1005- 8982 (2017) 09- 0069- 05

MALDI-TOF MS 技术在鉴定 临床少见非发酵菌中的应用

周宋元, 黄颖, 徐元宏

(安徽医科大学第一附属医院 检验科, 安徽 合肥 230022)

摘要:目的 评价基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 MALDI-TOF MS 技术在快速鉴定临床少见非发酵菌中的应用价值。**方法** 选取 2013 年 7 月 - 2016 年 10 月安徽医科大学第一附属医院检验科分离的 67 株临床少见非发酵菌,包括痰液分离的 21 株,尿液分离的 13 株,血液分离的 9 株,骨髓液分离的 9 株,分泌物分离的 8 株,腹透液分离的 2 株,脑脊液分离的 1 株,胆汁分离的 1 株,其他体液分离的 3 株。以 16S 核糖体 RNA (16S rRNA) 序列分析为金标准,比较 MALDI-TOF MS 与 Vitek2 Compact 鉴定系统鉴定的准确性。**结果** 67 株临床少见非发酵菌中,MALDI-TOF MS 将 66 株 (98.5%) 鉴定到种水平,1 株 (1.5%) 鉴定到属水平;Vitek2 Compact 鉴定系统将 59 株 (88.1%) 鉴定到种水平,8 株 (11.9%) 未能鉴定;67 株少见非发酵菌均扩增到 16S rRNA 目的基因片段并成功测序,67 株 (100.0%) 都成功鉴定到种水平。以 16S rRNA 序列分析为金标准,MALDI-TOF MS 和 Vitek2 Compact 鉴定系统正确鉴定到种水平准确性分别为 98.5% (66/67) 和 88.1% (59/67)。**结论** 与传统的细菌生化反应方法相比,MALDI-TOF MS 技术操作简便、耗时短、费用低,鉴定结果与 16S rRNA 序列分析的符合率高,可以提高临床对少见非发酵菌鉴定的准确率。

关键词: 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱;非发酵菌;鉴定

中图分类号: R371;R446.5

文献标识码: A

Application of matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry technique for identification of rare non-fermentative bacteria in clinic

Song-yuan Zhou, Ying Huang, Yuan-hong Xu

(Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University,
Hefei, Anhui 230022, China)

Abstract: Objective To evaluate the application value of matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) technique in the rapid identification of rare non-fermentative bacteria. **Methods** From July 2013 to October 2016, 67 clinical isolates of rare non-fermentative bacteria were collected from the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, which included 21 strains isolated from sputum, 13 strains from urine, 9 strains from blood, 9 strains from bone marrow, 8 strains from secretions, 2 strains from peritoneal dialysis fluid, 1 strain from cerebrospinal fluid, 1 strain from bile, and 3 strains from other body fluids. According to the gold standard of 16S rRNA sequence analysis, the accuracy of the identification system of MALDI-TOF MS and Vitek2 Compact was compared. **Results** In the 67 strains of bacteria, MALDI-TOF MS technique identified 66 strains (98.5%) to species level and 1 strains (1.5%) to genus level; while Vitek2 Compact identified 59 strains (88.1%) to species level, and 8 strains (11.9%) failed to identify. 16S rRNA gene fragments were amplified from the 67 strains of experimental bacteria and successfully sequenced, all of the strains were identified to species level. Using 16S rRNA sequence analysis as the

收稿日期: 2016- 11- 07

[通信作者] 徐元宏, E-mail: xyhong1964@163.com; Tel: 13505694447

gold standard, the accuracy of MALDI-TOF MS system and Vitek2 Compact system for identification at the species level was 98.5% (66/67) and 88.1% (59/67) respectively. **Conclusions** Compared with traditional bacteria biochemical reaction method, MALDI-TOF MS technique is simple, rapid and inexpensive. Its accuracy of identification result is highly consistent with that of 16SrRNA sequence analysis, MALDI-TOF MS technique can improve the accuracy of clinical identification of non-fermentative bacteria.

Keywords: matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry; non-fermentative bacteria; identification

临床上分离的常见非发酵菌以铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌等为主^[1-2],对较少分离的非发酵菌目前用传统的生化反应方法鉴定,影响因素较多,鉴定结果不理想。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)是近年来应用于临床病原微生物快速鉴定的一项新技术,不同的细菌经 MALDI-TOF MS 系统检测可形成特异性的蛋白图谱,将待测细菌的蛋白图谱与已有图库进行比对,即可确定细菌种属。本研究应用 Vitek2 Compact 鉴定系统、MALDI-TOF MS 技术及 16S 核糖体 RNA(16S ribosomal RNA, 16SrRNA) 序列分析 3 种方法对 67 株临床少见非发酵菌进行鉴定比较,以评估质谱技术在鉴定临床少见非发酵菌中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 实验菌株

选取 2013 年 7 月 - 2016 年 10 月于安徽医科大学第一附属医院检验科分离的 67 株临床少见非发酵菌,包括痰液分离的 21 株,尿液分离的 13 株,血液分离的 9 株,骨髓液分离的 9 株,分泌物分离的 8 株,腹透液分离的 2 株,脑脊液分离的 1 株,胆汁分离的 1 株及其他体液分离的 3 株。剔除同一患者相同部位的重复菌株。所有菌株转入菌种液置入 -80℃ 冰箱冷冻保存,统一检测。

1.2 实验仪器与试剂

VITEK2 COMPACT 全自动细菌鉴定仪及配套革兰阴性细菌鉴定卡(法国生物梅里埃公司), VITEK MS 质谱仪(法国生物梅里埃公司),细菌 DNA 抽提试剂盒与聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR) 扩增试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司), DL 2000 DNA Marker(日本 TaKaRa 公司), PCR 扩增仪(德国 Biometra 公司),电泳仪(北京六一仪器厂),凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司),数显恒温水浴锅(金坛市江南仪器厂),超速低温离心机

(美国 Sigma 公司), -80℃ 超低温冰箱(日本 SANYO 公司)。

1.3 质控和校准菌株

质控:大肠埃希菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853、嗜麦芽窄食单胞菌 ATCC 17666;校准:大肠埃希菌 ATCC 8739。菌株均采购于国家卫生和计划生育委员会临床检验中心。

1.4 细菌分离培养及鉴定

1.4.1 VITEK2 COMPACT 鉴定 按常规方法^[3]进行细菌分离培养,挑取纯菌落配 0.5 麦氏浊度的菌悬液,再用 VITEK2 COMPACT 全自动微生物鉴定仪及配套的革兰阴性细菌鉴定卡进行菌种鉴定。

1.4.2 MALDI-TOF MS 鉴定 ①靶板制备:取 1μl 一次性接种环将新鲜的校准菌株大肠埃希菌 ATCC 8739 涂在质谱仪靶板的校准位点,取新鲜的待测纯菌落涂在各个测试靶点上,每个靶点滴加 1μl α-氰基-4-羟基肉桂酸基质液,待菌株完全干燥后上机。②上机分析:在电脑上输入靶板号与标本号,点击传输到仪器系统软件,仪器打开舱门,将靶板放入靶板槽,待仪器门关闭完成,仪器开始自动分析。软件自动与数据库 VITEK MS-IVD 数据库 V2.0 版本)中已知菌种的蛋白图谱进行比对,从而得出最终鉴定结果。

1.4.3 16SrRNA 序列分析 将细菌鉴定系统鉴定过的纯菌落接种于配置好的肉汤中,置入 35℃ 温箱中摇菌(200 r/min) 过夜,取过夜菌悬液在室温下 8 000 r/min 离心 1 min,取沉淀物严格按照细菌基因组脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA) 抽提试剂盒步骤提取细菌 DNA。参照相关文献[4],选用 16SrRNA 细菌通用引物,配 PCR 体系 50μl,进行扩增。27F 正向引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R 反向引物:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。取 PCR 产物 8μl 加入 1% 琼脂糖凝胶电泳,通过凝胶成像仪观察,确认目标基因扩增成功,PCR 产物送上海生工生物工程股份有限公司,结果参照美国临床和实验室标准协会 MM18-A 解释的标准^[5]在

美国国立生物技术信息中心核酸数据库中进行比对。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计数资料以百分比 (%) 表示,用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 标准菌株鉴定结果

质控菌株经 PCR 扩增后电泳凝胶系统成像均在 1 500 bp 处获得阳性产物,与预期片段大小吻合。所测序列与核酸数据库中的相应菌株比对分析结果完全符合。见图 1、2。

2.2 67 株实验菌株电泳结果

16S rRNA 基因 PCR 扩增后电泳凝胶系统成像均在 1 500 bp 处获阳性产物,与预期片段大小吻合。见图 3。

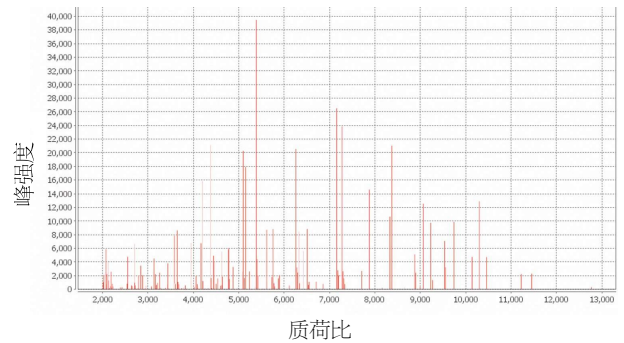
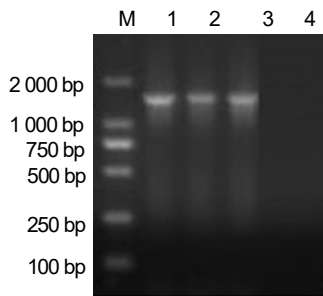


图 2 大肠埃希菌 ATCC 25922 蛋白质谱图

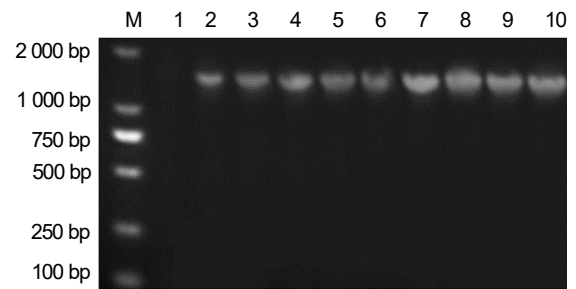
2.3 Vitek2 Compact 系统、MALDI-TOF MS 及 16S rRNA 序列分析结果比较

2.3.1 Vitek2 Compact 系统与 MALDI-TOF MS 比较 67 株临床少见非发酵菌株,其中 59 株 (88.1%) Vitek2 Compact 系统与 MALDI-TOF MS 鉴定结果在种水平一致,5 株 (7.5%) Vitek2 Compact 系统与



M: DNA marker; 1~3: 质控菌株; 4: 阴性对照组

图 1 质控菌株电泳图



M: DNA marker; 1: 阴性对照; 2: 铜绿假单胞菌阳性对照; 3~10: 部分实验菌株

图 3 部分实验菌株电泳图

表 1 Vitek2 Compact、MALDI-TOF MS 及 16S rRNA 序列分析鉴定在种水平一致的菌株

Vitek2 鉴定 (GN 卡)	株数	标本来源	MALDI-TOF MS 鉴定	16S rRNA 序列分析
缺陷短波单胞菌	2	尿	缺陷短波单胞菌	缺陷短波单胞菌
人苍白杆菌	1	痰	人苍白杆菌	人苍白杆菌
产吡啶金黄杆菌	3	尿	产吡啶金黄杆菌	产吡啶金黄杆菌
食酸代尔夫特菌	7	骨髓、痰	食酸代尔夫特菌	食酸代尔夫特菌
木糖无色杆菌氧化亚种 / 反硝化亚种	17/10	血、痰、尿、分泌物、骨髓	木糖无色杆菌氧化亚种 / 反硝化亚种	木糖无色杆菌氧化亚种 / 反硝化亚种
琼氏不动杆菌	6	血、痰	琼氏不动杆菌	琼氏不动杆菌
少动鞘氨醇单胞菌	1	腹透液	少动鞘氨醇单胞菌	少动鞘氨醇单胞菌
食神鞘氨醇杆菌	1	尿	食神鞘氨醇杆菌	食神鞘氨醇杆菌
栖稻假单胞菌	1	痰	栖稻假单胞菌	栖稻假单胞菌
皮氏罗尔斯顿菌	2	导管液	皮氏罗尔斯顿菌	皮氏罗尔斯顿菌
荧光假单胞菌	2	痰	荧光假单胞菌	荧光假单胞菌
施氏假单胞菌	2	分泌物	施氏假单胞菌	施氏假单胞菌
粪产碱杆菌	2	分泌物	粪产碱杆菌粪亚种	粪产碱杆菌粪亚种
恶臭假单胞菌	2	尿、痰	恶臭假单胞菌	恶臭假单胞菌

注: GN21341 卡为革兰阴性细菌鉴定卡 (法国梅里埃公司配套)

MALDI-TOF MS 鉴定结果在属水平不一致;Vitek2 Compact 系统无法鉴定的菌株有 8 株 (11.9%), MALDI-TOF MS 只鉴定到属水平的有 1 株 (1.5%)。两种鉴定技术比较,经配对 χ^2 检验,差异有统计学意义 ($\chi^2=12.319, P=0.000$),提示两种鉴定技术一致性或关联性较好。两种鉴定技术优势性比较,差异无统计学意义 ($\chi^2=0.800, P=0.371$)。见表 1~3。

表 2 Vitek2 Compact、MALDI-TOF MS 及 16sRNA 序列分析鉴定在属水平不同的菌株

Vitek2 鉴定 (GN 卡)	株数	标本来源	MALDI-TOF MS 鉴定	16sRNA 序列分析
鞣丸酮丛毛单胞菌	1	骨髓	食酸代尔夫特菌	食酸代尔夫特菌
皮氏罗尔斯顿菌	1	尿	产吡啶金黄杆菌	产吡啶金黄杆菌
放射根瘤菌	1	痰	鲍曼不动复合菌	鲍曼不动杆菌
紫色杆菌	1	尿	鲍曼不动杆菌	鲍曼不动杆菌
脑膜炎毒伊丽莎白菌	1	尿	产吡啶金黄杆菌	产吡啶金黄杆菌

表 3 Vitek2 Compact 无法鉴定菌株与 MALDI-TOF MS、16sRNA 序列分析鉴定菌株比较

Vitek2 鉴定 (GN 卡)	株数	标本来源	MALDI-TOF MS 鉴定	16sRNA 序列分析
无鉴定结果	1	痰	嗜水气单胞菌	嗜水气单胞菌
无鉴定结果	1	分泌物	施氏假单胞菌	施氏假单胞菌
无鉴定结果	1	痰	莫拉菌属	奥斯陆莫拉菌

2.3.2 进一步鉴定分析 该 67 株临床少见非发酵菌均扩增到 16SrRNA 目的基因片段并成功测序, 67 株 (100%) 都鉴定到种水平。以 16SrRNA 序列分析为金标准,其中 Vitek2 Compact 鉴定系统将临床少见非发酵菌正确鉴定到种水平准确性为 88.1% (59/67),而 MALDI-TOF MS 正确鉴定到种水平准确性较高,为 98.5% (66/67)。见图 4~6。

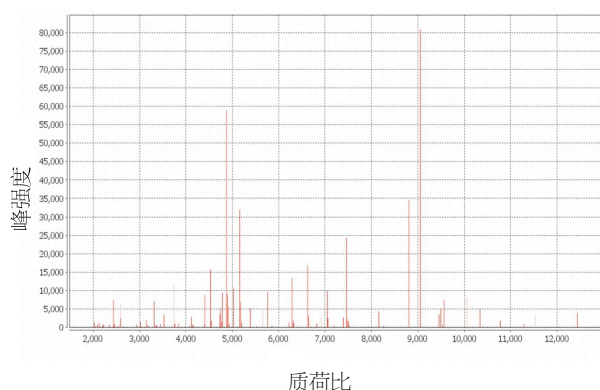


图 4 人苍白杆菌蛋白质谱图

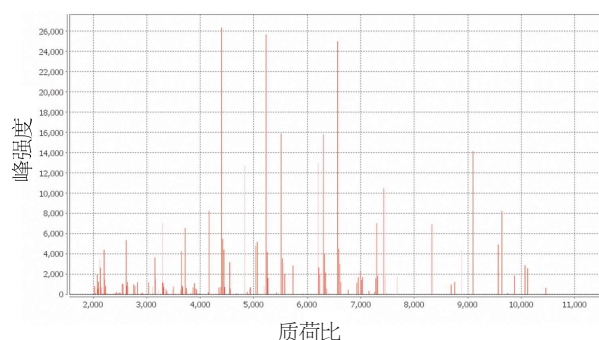


图 5 皮氏罗尔斯顿菌蛋白质谱图

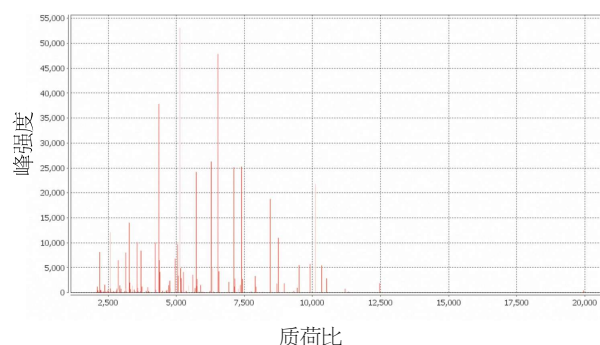


图 6 食酸代尔夫特菌蛋白质谱图

3 讨论

非发酵菌是一大群条件致病菌,最近几年来,由于抗生素的不合理使用导致本来为条件致病菌的非发酵菌成为重要的临床致病菌,广泛播散^[9]。目前,传统的微生物鉴定技术已经很难满足临床的需求,检验科微生物室急需一种简便、高效、快速的鉴定方法。近年来,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术作为一种新兴的微生物鉴定技术,在国内外广受关注^[7-12]。MALDI-TOF MS 技术于 2011 年获得欧洲共同体体外诊断认证,2012 年 8 月获得中国 CFDA 注册证,2013 年 8 月获得美国 FDA 认证,意味着应用 MALDI-TOF MS 技术的质谱仪真正进入临床微生物和患者诊疗。许多研究都对 MALDI-TOF MS 技术进行评价,认为其在临床微生物领域有广阔的应用前景,值得期待。MALDI-TOF MS 技术是利用已有的蛋白质谱指纹库中的信息或建立新的蛋白质谱指纹库数据,通过比较待测菌株与标准菌株的质谱图而对微生物的种属进行鉴定^[13-14]。

本研究应用 MALDI-TOF MS、16SrRNA 序列分析及 Vitek2 Compact 鉴定系统同时对 67 株临床少见非发酵菌进行鉴定,根据实验结果数据分析评价 MALDI-TOF MS 技术在快速鉴定临床少见非发酵菌中的应用价值。实验提示,MALDI-TOF MS 技术

正确鉴定到种水平的鉴别能力高于 Vitek2 Compact 鉴定方法。而 Vitek2 Compact 与 MALDI-TOF MS 方法无法鉴定的疑难细菌,使用 16S rRNA 序列分析均能成功鉴定。这与叶乃芳等^[15]做的 90 株临床疑难细菌的质谱鉴定与 Vitek2 Compact 鉴定比较的结论一致。

本研究收集的少见非发酵菌标本,数量较少,有待后续的研究中收集多家医院相关菌株,进一步评估 MALDI-TOF MS 技术在鉴定少见非发酵菌的应用价值。

尽管 MALDI-TOF MS 技术在鉴定临床微生物中已经得到广泛认可,但是还有很多影响其鉴定结果的因素,如基质的选择、样品的前处理方式、数据库的完善等,应该引起学者日常工作的重视^[16]。所以在临床微生物检验中建立规范化的培养、恰当的样品处理方式和标准的质谱分析操作流程,将能提高质谱技术鉴定的准确性。

综上所述,与传统的细菌生化反应方法相比, MALDI-TOF MS 技术操作简便、耗时短、费用低,鉴定结果与 16S rRNA 序列分析的符合率高,可以提高临床对少见非发酵菌鉴定的准确率。临床上应不断完善细菌蛋白图谱数据库,从而进一步提高对细菌的鉴定水平。

参 考 文 献:

- [1] 李虹玲,刘文恩,晏群,等. 从临床标本中分离出的病原性细菌的分布及耐药性分析[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(10): 40-44.
- [2] 周翔天,高丽萍,夏粤华,等. 2008-2012年安徽省3154株非发酵菌分布特点及耐药分析[J]. 中国抗生素杂志, 2014, 39(4): 301-305.
- [3] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 第3版. 南京:东南大学出版社, 2006: 760-799.
- [4] 曹敬荣,陈静,高世超,等. 应用通用引物 PCR 检测诊断细菌和真菌性中枢神经系统感染的价值[J]. 中国感染控制杂志, 2016, 15(3): 145-149.
- [5] PETTI C A, BOSSHARD P P, BRANDT M E, et al. Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing; approved guideline. CLSI document MM 18-A [J]. Clin Lab Stand Institute, 2008, 28(12): 1-17.
- [6] 王军,刘勇. 常见非发酵菌的临床分布及耐药性分析[J]. 实用药物与临床, 2016, 19(2): 235-240.
- [7] 顾丹霞,于涛,张晓飞,等. MALDI BIOTYPER 和 VITEK MS 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱对链球菌鉴定的比较研究[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(2): 98-101.
- [8] 罗燕萍. 质谱技术在临床微生物实验室中的应用前景[J]. 检验医学, 2015, 30(2): 97-101.
- [9] 戴颖欣,李敏. MALDI-TOF MS 在临床微生物检验中的应用[J]. 检验医学, 2015, 30(2): 102-107.
- [10] LEE W, KIM M, YONG D, et al. Evaluation of vitek mass spectrometry (ms), a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight ms system for identification of anaerobic bacteria[J]. Clinical Microbiology, Ann Lab Med, 2015, 35: 69-75.
- [11] KIM E, CHO Y, LEE Y, et al. A proteomic approach for rapid identification of Weissella species isolated from Korean fermented foods on MALDI-TOF MS supplemented with an in-house database[J]. Int J Food Microbiol, 2016, 243: 9-15.
- [12] RODRIGUEZ-SANCHEZ B, ALCALA L, MARIN M. Evaluation of MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry) for routine identification of anaerobic bacteria[J]. Anaerobe, 2016, 42: 101-107.
- [13] FAGERQUIST C K. Unlocking the proteomic information encoded in MALDI-TOF-MS data used for microbial identification and characterization[J]. Expert Rev Proteomics, 2017, 14(1): 97-107.
- [14] CHERKAoui A, HIBBS J, EMONET S, et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass-spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level [J]. Clinical Microbiology, 2010, 48: 1169-1175.
- [15] 叶乃芳,凌华志,黄颖,等. 16S rRNA 序列分析技术对临床标本中疑难细菌的鉴定[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(7): 1000-1003.
- [16] 范铁男,邹积宏,卢行安,等. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术用于常见益生菌鉴定的初步研究[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(10): 868-875.

(童颖丹 编辑)