

• 检验技术与方法 •

应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术鉴定临床常见厌氧菌

袁 梁, 顾海彤, 耿佳靖, 王 玫, 鲁辛辛[△]

(首都医科大学附属北京同仁医院检验科, 北京 100730)

摘要:目的 应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术对临床分离的厌氧菌进行鉴定, 与传统 Vitek32 ANI 鉴定卡及 16S rRNA 基因序列法鉴定进行比较, 分析 MALDI-TOF MS 技术用于鉴定临床常见厌氧菌的可行性。方法 收集从临床标本培养分离的厌氧菌 56 株, 运用 MALDI-TOF MS 技术对其进行鉴定, 同时运用 Vitke32 ANI 鉴定卡及 16S rRNA 基因序列法分别进行鉴定, 将三者的结果进行比较。结果 56 株厌氧菌中有 41 株采用 MALDI-TOF MS 技术鉴定至种的水平(分值大于或等于 2.0), 11 株鉴定至属的水平(分值为 1.7~2.0), 4 株无可靠结果(分值小于 1.7)。MALDI-TOF MS 和 16S rRNA 基因序列法鉴定结果一致的占 94.6%(53/56), 不一致的占 5.6%(3/56)。MALDI-TOF MS 与 Vitke32 ANI 鉴定卡的鉴定结果一致的占 80.4%(45/56), 不一致的占 19.6%(11/56)。结论 MALDI-TOF MS 与 16S rRNA 基因序列法鉴定的符合率高, 可应用于临床常见厌氧菌的鉴定。

关键词: 细菌, 厌氧; 光谱法, 质量, 基质辅助激光解吸电离; 基因, rRNA

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.03.031

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)03-0327-03

Identification of anaerobic bacteria from clinical specimens by MALDI-TOF MS

Yuan Liang, Gu Haitong, Geng Jiajing, Wang Mei, Lu Xinxin[△]

(Department of Clinical Laboratory, Beijing Tongren Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

Abstract: **Objective** To evaluate whether matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) could be used to identify the clinical anaerobic isolates, we compared the method of MALDI-TOF MS with the conventional method of Vitek32 ANI card and that of 16S rRNA gene sequencing. **Methods** We identified 56 clinical anaerobic isolates from Beijing Tongren hospital by MALDI-TOF MS, Vitke32 ANI card and 16S rRNA gene sequencing. Then we compared these identification results of MALDI-TOF MS with those of Vitke32 ANI card and those of 16S rRNA gene sequencing, respectively. **Results** MALDI-TOF MS identified 41 of 56 isolates (73.2%) at species level (log score ≥ 2.0) and 11 of those (19.6%) at genus level (log score = 1.7–2.0), while 4 of those (7.1%) were given non-reliable identification (log score < 1.7). 53 isolates (94.6%) of these results were consistent with those of 16S rRNA gene sequencing, though only 45 of 56 isolates (80.4%) are the same identification of Vitke32 ANI card. **Conclusion** These results showed that MALDI-TOF MS could correctly identify the clinical anaerobic isolates more than the conventional method of Vitke32 ANI card, so MALDI-TOF MS could be applied to the routine identification of clinical anaerobic bacteria.

Key words: bacteria, anaerobic; spectrometry, mass, matrix-assisted laser desorption-ionization; genes, rRNA

厌氧菌感染常见于临床深部组织及血液感染, 随着临床对厌氧菌感染的日益重视以及细菌培养技术的提高, 其培养阳性率也逐渐提高。厌氧菌对培养条件及鉴定条件要求苛刻。传统生化鉴定技术易受到环境影响且鉴定周期长, 已不能满足临床实验室快速准确鉴定厌氧菌的要求。厌氧菌 16S rRNA 基因序列法虽然有快速、准确的优点, 但操作复杂、成本较高, 不适合作为临床实验室检测项目开展^[1]。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)是一种新型的软电离生物质谱, 具有灵敏度、准确度、分辨率高的特点, 而且操作简单、成本低廉, 可高通量检查样本, 为临床微生物检验提供了一种新型的有效手段^[2-4]。本研究通过比较 56 株临床厌氧菌 MALDI-TOF MS 鉴定、Vitek32 ANI 鉴定卡及 16S rRNA 基因序列法鉴定的结果, 评价了 MALDI-TOF MS 技术鉴定临床厌氧菌的可行性。

1 材料与方法

1.1 质控菌株 采用脆弱拟杆菌 ATCC25285。

1.2 仪器与试剂 autoflex III MALDI-TOF MS 质谱仪及其

配套试剂(德国布鲁克公司生产); Vitek32 全自动微生物鉴定系统及 ANI 鉴定卡(法国梅里埃公司生产); CEQ8000 基因分析系统及其配套试剂(美国贝克曼公司生产)。

1.3 方法

1.3.1 菌株准备 选取临床标本培养出的 56 株厌氧菌用分区划线法转种于 CDC 厌氧平皿(天津金章公司提供)中, 放入厌氧培养系统(荷兰 MART 公司生产), 37℃ 培养 48~72 h 至可见清晰的单个菌落。

1.3.2 MALDI-TOF MS 质谱仪鉴定 参数设置: 线性操作模式, 正离子, 基质抑制偏转模式, 脉冲离子提取时间 350 ns, 相对分子质量为 2 000~20 000。样本处理: 挑取单个菌落加入无菌水 300 μ L, 混匀后加入无水乙醇 900 μ L, 以 12 000 r/min 离心 2 min, 弃上清液后加入 50 μ L 乙腈与 50 μ L 70% 甲酸, 混匀后以 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清液 1 μ L 点靶, 自然干燥后用 1 μ L 基质覆盖, 室温干燥备用。数据采集分析: 应用 Biotyper3.0 软件及数据库(质谱微生物蛋白信息数据库更新时间为 2012 年)进行采集分析。质谱图用 MALDI-TOF MS

线性正性模式的^{最大频率采集}。MALDI-TOF MS 分值大于或等于 2.0 表明可鉴定至种的水平,分值为 1.7~2.0 表明可鉴定至属的水平,分值小于 1.7 则表明无可靠结果。

1.3.3 Vitke32 ANI 卡鉴定 样本处理:选取单个菌落,将菌液浓度调整至 3 个麦氏单位,充菌液后上机检测。结果分析:采用 Vitke32 软件进行分析。出现多个结果时选择分值最高的鉴定结果。

1.3.4 16S rRNA 基因序列法鉴定 选取 16S rRNA 基因通用引物,引物序列设计如下,上游引物 BAK11W:5'-AGT TGA TCT GGC TCA G-3',下游引物 BAK2:5'-GGA CTA CGA GGT ATC TAA T-3'(796 bp)^[5]。对 PCR 产物进行序列测定,测定结果在美国国家生物信息中心数据库(NCBI)进行比对。16S rRNA 基因序列法鉴定法作为“金标准”用于其他两种方法的比较。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,使用配对计数资料的 χ^2 检验对 MALDI-TOF MS 鉴定结果与其他两种方法的结果分别比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 质控菌株鉴定结果 质控菌株脆弱拟杆菌 ATCC25285 MALDI-TOF MS 鉴定分值均大于或等于 2.0。Vitek32 ANI 鉴定卡的检出率大于或等于 99.9%,16S rRNA 基因序列与 NCBI 数据的符合率均大于或等于 99%。

2.2 临床分离的 56 株厌氧菌的鉴定结果 56 株厌氧菌中 MALDI-TOF MS 鉴定分值大于 2.0 占的 73.2%(41/56),鉴定分值为 1.7~2.0 的占 19.6%(11/56),鉴定分值小于 1.7 的占 7.1%(4/56)。56 株厌氧菌 16S rRNA 基因序列鉴定结果与 NCBI 数据比对的符合率大于或等于 98%。

表 1 56 株厌氧菌分别用 3 种方法进行鉴定的情况(n)			
细菌名称	MALDI-TOF MS	Vitek32 ANI 鉴定卡	16S rRNA 基因序列法
脆弱拟杆菌	16	13	16
多形拟杆菌	0	2	0
痤疮丙酸杆菌	6	7	6

表 2 鉴定结果不一致的 11 株厌氧菌的具体情况			
序号	MALDI-TOF MS 鉴定(分值)	Vitek32 ANI 鉴定卡鉴定	16S rRNA 基因鉴定(符合率*)
1	二路普雷沃菌(2.126)	口腔普雷沃菌	二路普雷沃菌(98.97%)
2	颊普雷沃菌(1.988)	口腔普雷沃菌	颊普雷沃菌(98.86%)
3	脆弱拟杆菌(2.051)	多形拟杆菌	脆弱拟杆菌(99.78%)
4	脆弱拟杆菌(2.165)	多形拟杆菌	脆弱拟杆菌(99%)
5	脆弱拟杆菌(2.145)	中间普雷沃菌	脆弱拟杆菌(99.54%)
6	第三梭菌(1.988)	败毒梭菌	第三梭菌(99%)
7	麻疹李生球菌(2.314)	厌氧消化链球菌	麻疹李生球菌(100%)
8	贪婪丙酸杆菌(1.542)	痤疮丙酸杆菌	贪婪丙酸杆菌(98.89%)
9	巴氏梭菌(1.642)	坏死梭杆菌	具核梭杆菌(99%)
10	发酵乳杆菌(1.524)	詹氏乳杆菌	卷曲乳杆菌(98.92%)
11	第三梭菌(1.453)	双酶梭菌	产气荚膜梭菌(99%)

*:与 NCBI 数据库中的序列进行比较。

3 讨 论

MALDI-TOF MS 技术是近年来发展起来的一种新的检测技术,通过激光照射样品与基质形成的共结晶薄膜,基质从激光中吸收能量传递给生物大分子,使生物大分子电离。离子在电场作用下加速飞过飞行管道,测定离子的质荷比与离子的

续表 1 56 株厌氧菌分别用 3 种方法进行鉴定的情况(n)			
细菌名称	MALDI-TOF MS	Vitek32 ANI 鉴定卡	16S rRNA 基因序列法
贪婪丙酸杆菌	1	0	1
难辨梭菌	4	4	4
具核梭菌	2	2	3
第三梭菌	4	2	3
败毒梭菌	0	1	0
双酶梭菌	0	1	0
巴氏梭菌	1	0	0
坏死梭杆菌	0	1	0
颊普雷沃菌	5	4	5
二路普雷沃菌	3	2	3
中间普雷沃菌	0	1	0
口腔普雷沃菌	2	4	2
二氧化碳噬纤维菌	3	3	3
厌氧消化链球菌	4	5	4
麻疹李生球菌	4	3	4
产气荚膜杆菌	0	0	1
发酵乳杆菌	1	0	0
詹氏乳杆菌	0	1	0
卷曲乳杆菌	0	0	1

2.3 3 种鉴定方法的比较 MALDI-TOF MS、Vitek32 ANI 鉴定卡、16S rRNA 基因序列法鉴定结果一致的占 80.4%(45/56);MALDI-TOF MS、16S rRNA 基因序列法鉴定结果一致的占 94.6%(53/56),见表 1。11 株厌氧菌的 MALDI-TOF MS 与 Vitek32 ANI 鉴定卡鉴定结果不一致,其中 8 株 MALDI-TOF MS 与 16S rRNA 基因序列法鉴定结果一致,1 株 MALDI-TOF MS 鉴定分值小于 1.7,但其结果仍与 16S rRNA 基因序列法鉴定相同,见表 2。MALDI-TOF MS 与 Vitek32 ANI 鉴定卡的鉴定结果比较,二者差异有统计学意义($\chi^2=8.0,P<0.05$),MALDI-TOF MS 鉴定的符合率更高。MALDI-TOF MS 与 16S rRNA 基因序列法的鉴定结果相比较,差异无统计学意义($\chi^2=3.0,P>0.05$)。

飞行时间成正比,从而可以分析出样品的分子构成。MALDI-TOF MS 技术能对微生物的蛋白质、脂类、多肽及其他能被离子化的多种成分进行分析,而这些成分具有微生物种属特异性,可作为微生物的鉴定指标^[4,8-9]。

目前,国内普遍采用生化鉴定技术进行厌氧菌鉴定,这种

鉴定方法受到多方面因素的影响。首先,厌氧菌生长缓慢,鉴定时间可能长达数天。其次,某些厌氧菌的生化反应难以区分,而且厌氧菌生长条件苛刻,其生化反应受实验条件影响很大^[3,7-9],因此传统的生化鉴定容易给出错误的或者是鉴定率低的鉴定结果。16S rRNA 基因序列法鉴定技术被认为是厌氧菌鉴定技术的金标准^[1,3],结果准确可靠,但基因测序鉴定操作复杂,对实验室人员要求较高。目前,广泛使用的二代测序仪不能实现高通量测序,效率较低,临床实验室很难常规开展此项技术。因此,临床实验室迫切希望寻找到一种操作简单、快速、准确的厌氧鉴定新技术,MALDI-TOF MS 技术无疑是较好的选择^[2-3,9-10]。

本研究中 56 株厌氧菌 MALDI-TOF MS 与 16S rRNA 基因序列法鉴定的符合率为 94.6%;传统生化 Vitek32 ANI 鉴定卡与 16S rRNA 基因序列法鉴定结果的符合率为 80.4%。MALDI-TOF MS 技术鉴定的符合率高于传统生化鉴定技术。MALDI-TOF MS 仪器操作简单,即使批量鉴定也可在 1~2 h 完成,16S rRNA 基因序列法至少需要 4~6 h 才能完成一个检测周期^[1,5],而 Vitek32 ANI 鉴定卡则需要 24~72 h 才能获得结果^[8],在快速检测与高通量检测方面 MALDI-TOF MS 优势明显,而且 MALDI-TOF MS 所使用试剂价格低廉,成本也具有有一定优势。

本研究中,4 株厌氧菌的鉴定结果分值小于 1.7,占 7.1%(4/56),其中 3 株的结果与 16S rRNA 基因序列法的鉴定结果不一致。有学者认为这与 Biotyper 软件数据库不完善有关^[4],Biotyper3.0 软件包含 212 种厌氧菌质谱数据,涵盖大部分临床常见厌氧菌,但如果希望进一步提高鉴定成功率及扩大使用范围,仍需完善 MALDI-TOF MS 的数据库^[4,6-9]。也有研究表明,菌落培养条件及 MALDI-TOF MS 菌株前处理会影响质谱结果的重复性及一致性。另外,有些同源性很高的细菌难以通过质谱区分^[5-6,8,11]。

总的来说 MALDI-TOF MS 技术具有快速、准确、高通量的特点,随着国内外临床实验室的广泛应用及数据库的进一步完善,必将在微生物鉴定、分型、耐药监测等多方面发挥更大作用^[2,11-12]。

参考文献

- [1] Kiratisin P, Li L, Murray PR, et al. Identification of bacteria recovered from clinical specimens by 16S rRNA gene sequencing [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2003, 22(10): 628-631.
- [2] García P, Allende F, Legarraga P, et al. Bacterial identification

based on protein mass spectrometry: A new insight at the microbiology of the 21st century[J]. Rev Chilena Infectol, 2012, 29(3): 263-272.

- [3] Fedorko DP, Drake SK, Stock F, et al. Identification of clinical isolates of anaerobic bacteria using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31(9): 2257-2262
- [4] van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(3): 900-907.
- [5] 鲁辛辛, 吴薇, 王玫, 等. 16S rRNA 基因序列鉴定标本中病原细菌的方法学研究[J]. 中华医学杂志, 2008, 88(2): 123-126.
- [6] 张明新, 朱敏, 王玫, 等. 应用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴定常见细菌和酵母菌[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(11): 988-992.
- [7] Hrabák J, Chudácková E, Walková R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis[J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(1): 103-114.
- [8] Robert PR, Brosnikoff C, Turnbull L, et al. Kathy ristow and Ann krilcich. multicenter evaluation of the vitek 2 anaerobe and corynebacterium identification card[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(8): 2646-2651.
- [9] Nagy E, Becker S, Kostrzewa M, et al. The value of MALDI-TOF MS for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria in routine laboratories[J]. J Med Microbiol, 2012, 61(10): 1393-1400.
- [10] Biswas S, Rolain JM. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture[J]. J Microbiol Methods, 2013, 92(1): 14-24.
- [11] Rettinger A, Krupka I, Grünwald K, et al. Leptospira spp. strain identification by MALDI TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST) [J]. BMC Microbiol, 2012, 12(1): 185.
- [12] 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: 2013-11-08)

(上接第 326 页)

- American heart association/American stroke association [J]. Stroke, 2011, 42(1): 227-276.
- [12] 孟磊. 同型半胱氨酸及高敏 C 反应蛋白与脑梗死的相关性研究 [J]. 医药论坛杂志, 2011, 32(10): 53-54.
- [13] 刘国峰, 徐文俭, 孙顺成. 不同年龄组急性脑梗死与血浆同型半胱氨酸水平的关系 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2010, 27(7): 659.
- [14] 侯东哲, 高晓刚, 李毅. 超敏 C 反应蛋白、同型半胱氨酸与脑卒中严重程度及日常生活活动能力相关性分析 [J]. 中国康复, 2011, 26(1): 22-24.
- [15] 陆敏, 赵红东, 唐冰. 高 Hcy 血症与急性缺血性脑卒中复发相关性研究 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2012, 20(3): 217-220.

- [16] 叶芸, 李苏亮, 刘凯歌, 等. 脂蛋白(a)和同型半胱氨酸在诊断及鉴别脑卒中的应用 [J]. 实用医学杂志, 2011, 27(20): 3675-3677.
- [17] 郭晓兵, 董德红. 急性脑梗死患者不同年龄阶段同型半胱氨酸水平的比较 [J]. 中国实用医刊, 2011, 38(15): 76-77.
- [18] 熊军, 熊勋波. 急性脑梗死患者同型半胱氨酸、高敏 C 反应蛋白及 D-二聚体水平的变化 [J]. 检验医学, 2011, 26(03): 198-200.
- [19] 黄齐亮. 血浆同型半胱氨酸水平与急性脑梗死的关系 [J]. 神经损伤与功能重建, 2012, 07(5): 346-347.
- [20] 邹耀兵, 江思德, 唐明山, 等. 同型半胱氨酸与脑梗死病因的相关性研究 [J]. 中国药业, 2012, 21(18): 29-30.

(收稿日期: 2013-10-27)