

论著 · 临床研究

Vitek MS 与 Bruker MS 对希木龙念珠菌复合体鉴定能力评估*

侯欣^{1,2,3}, 王贺^{1,2,3}, 肖盟^{1,2,3}, 李颖^{1,2,3}, 徐英春^{1,2,3△}

(1. 中国医学科学院北京协和医院检验科, 北京 100730; 2. 侵袭性真菌病机制研究与精准诊断北京市重点实验室, 北京 100730; 3. 中国医学科学院北京协和医学院研究生院, 北京 100730)

摘要:目的 评估中国医院侵袭性真菌监测网(CHIF-NET)2010—2015 年收集的希木龙念珠菌复合体原始鉴定、Vitek MS 和 Bruker MS 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)鉴定结果。方法 收集 CHIF-NET 2010—2015 年 40 株希木龙念珠菌和 5 株假希木龙念珠菌,所有菌株均经过分子生物学方法进行复核鉴定确认。以复核鉴定结果作为“金标准”,评估各医院原始常规方法鉴定结果,并评估 Vitek MS 和 Bruker MS 对希木龙念珠菌复合体的鉴定性能。结果 与分子生物学复核鉴定结果相比,希木龙念珠菌的原始鉴定准确率为 47.5%,分别有 15% 的菌株被显色培养,ATB Rapid ID32C,API 20C 或 Vitek 2 Compact 错误鉴定为奥默毕赤酵母和新型隐球菌;常规鉴定方法无法鉴定假希木龙念珠菌,其中 3 株被错误鉴定为希木龙念珠菌;与分子生物学鉴定结果相比,Vitek MS IVD2.0 和 Bruker MS DB 5 989 对希木龙念珠菌的鉴定准确率分别为 100.0%和 57.5%。Vitek MS IVD 2.0 数据库中无假希木龙念珠菌的参考谱图,故将 5 株菌全部错误鉴定为希木龙念珠菌,且可信度>90%。Vitek MS RUO 数据库中无希木龙念珠菌复合体参考谱图,故无鉴定结果。Bruker MS DB 5989 对假希木龙念珠菌的菌种鉴定准确率为 20%。Bruker MS 自建库后对所有菌株均能正确鉴定到种水平。结论 该研究率先在国内评估了 Vitek MS 与 Bruker MS 鉴定希木龙念珠菌复合体的性能,对于少见菌种的鉴定可通过增加数据库质谱谱图提高质谱的鉴定能力。

关键词:希木龙念珠菌复合体; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 酵母菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.24.009 **中图法分类号:**R446.1

文章编号:1673-4130(2018)24-3023-04 **文献标识码:**A

Evaluation of the performance of Vitek MS and Bruker MS on the identification of *Candida haemulonii* species complex*

HOU Xin^{1,2,3}, WANG He^{1,2,3}, XIAO Meng^{1,2,3}, LI Ying, XU Yingchun^{1,2,3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China; 2. Beijing Key Laboratory for Mechanisms Research and Precision Diagnosis of Invasive Fungal Diseases, Beijing 100730, China; 3. Graduate School of Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

Abstract: Objective To evaluate the results of original identification, Vitek MS and Bruker MS identification of *Candida haemulonii* species complex collected from National China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) 2010—2015. **Methods** A total of 40 *Candida haemulonii* and five *Candida duobushaemulonii* were collected from all hospitals in China as part of CHIF-NET 2010—2015. The original identification results were evaluated by setting the review results as "gold-standard", and the performances of Vitek MS and Bruker MS matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in the identification of the *C. haemulonii* species complex were observed. **Results** As compared with the molecular identification, the accurate rate of original identification of *C. haemulonii* was 47.5%, while 15% of the strains were mistakenly identified as *Kodamaea ohmeri* and *Cryptococcus neoformans* by CHROMagar chromogenic media, ATB Rapid ID32C, API 20C or Vitek 2 Compact system. *C. duobushaemulonii* could not be identified by using routine identification methods. As for the identification of the *C. haemulonii*, the accurate

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81572057);北京市重点实验室项目(BZ0447)。
作者简介:侯欣,女,博士研究生在读,主要从事微生物鉴定及耐药机制研究。 △ 通信作者, E-mail: xycpumch@139.com。

rate of the Vitek MS IVD2.0 and Bruker MS DB 5989 were 100% and 57.5%, respectively. There were no reference spectra for *C. duobushaemulonii* in the Vitek MS IVD 2.0 database, so it could not be identified by Vitek MS IVD 2.0 and misidentified all *C. duobushaemulonii* as *C. haemulonii* with confidence value >90%. There were no reference spectra for *C. haemulonii* complex in the Vitek MS RUO database, so this complex could not be identified by Vitek MS RUO. 20% of *C. duobushaemulonii* were identified correctly to species level by Bruker MS DB 5989. After complementation with the "in-house" database, all of the remaining isolates were correctly identified to species level. **Conclusion** This is the first study to evaluate the performances of Vitek MS and Bruker MS in the identification of *C. haemulonii* species complex in China. MALDI-TOF MS can provide rapid and accurate identification but is reliant on a robust mass spectra database. The performance of MALDI-TOF may be improved by adding mass spectral profiles into the current databases.

Key words: *Candida haemulonii* species complex; matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry; *Saccharomycetaceae*

侵袭性念珠菌病(IC)是住院患者最常见的真菌病,其病死率高达 40%^[1-2]。虽然白念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌和热带念珠菌是引起 IC 最常见的菌种,但一些新发和罕见的念珠菌被不断报道并有增高趋势^[3]。更重要的是,少见念珠菌种往往对常用抗真菌药物耐药,由于临床经验不足,缺乏重视,常常导致治疗失败^[4-5]。随着基因测序技术和系统分类学研究的发展,更多与疾病相关的念珠菌种被发现,真菌的命名也在不断改变和进步,发现了许多念珠菌复合体,如近平滑念珠菌复合体(近平滑念珠菌、似平滑念珠菌和拟平滑念珠菌)、光滑念珠菌复合体(光滑念珠菌、*Candida nivariensis* 和 *Candida bracarensis*)等。希木龙念珠菌复合体也是其中一种,通过核糖体转录间区(ITS)测序发现,该复合体包括希木龙念珠菌、希木龙念珠菌变种和假希木龙念珠菌(*C. duobushaemulonii*),能够引起腹膜炎、骨炎和念珠菌血症等^[6-7]。区分该复合体中的 3 种菌主要依赖于分子生物学方法,如 ITS 测序、D1/D2 测序和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)。希木龙念珠菌表型与无名念珠菌、季也蒙念珠菌相似,因此,使用传统的生化方法很难鉴定准确^[8]。商品化的表型鉴定方法,包括 API20C 和 Vitek 2 Compact 常常将其错误地鉴定为奥默毕赤酵母^[8-9]。值得注意的是,该复合体常常由于对两性霉素 B 和唑类高度耐药而导致患者预后不佳,并已有对棘白菌素耐药的菌株报道,多重耐药菌株给临床治疗带来巨大挑战^[6,10],因此,对该菌种准确鉴定具有重要的临床意义。

1 资料与方法

1.1 菌株来源及鉴定 选取我国多中心侵袭性真菌监测项目中国医院侵袭性真菌监测网(CHIF-NET) 2010—2015 年连续 6 年收集的酵母菌。在中心实验室,所有菌株均在沙保弱培养基上进行复活、传代及分纯。菌株使用 ITS 测序及 Vitek MS 方法复核鉴定。收集希木龙念珠菌复合体 45 株,其中 40 株希木龙念珠菌,5 株假希木龙念珠菌,无希木龙念珠菌变种。68.9%(31/45)的菌株分离自血液,13.3%(6/

45)分离自脑脊液。

1.2 试剂与仪器 法国生物梅里埃公司的 MALDI-TOF MS(Vitek MS)及配套的 Vitek MS-CHCA 基质、70%甲酸和靶板,德国 Bruker 公司的 Microflex MALDI-TOF 质谱仪(Bruker MS 5989),色谱纯乙腈、甲酸、无水乙醇(美国 Sigma 公司),真菌培养所用沙保弱平皿(英国 Oxide 公司)、念珠菌显色平皿(法国 CHROMagar 科玛嘉公司),传统表型鉴定试剂 ATB Rapid ID32C,API 20C 和 Vitek 2 Compact(法国生物梅里埃公司)和 ABI3730XL 一代测序仪(美国 ABI 公司)等。

1.3 方法

1.3.1 原始鉴定 45 株希木龙念珠菌复合体在原单位进行了原始鉴定,初步鉴定方法包括:显色培养基,ATB Rapid ID32C,API 20C 和 Vitek 2 Compact。初步鉴定结果与中心实验室分子生物学鉴定结果进行对比分析。

1.3.2 Vitek MS 鉴定 挑取单个菌落均匀涂布在靶板上,校准位置涂培养 24 h 的新鲜大肠埃希菌 ATCC8739 菌落,在涂布菌株干燥前,滴加 1 μ L 甲酸,待干燥后加入 1 μ L CHCA 基质,完全干燥后放入机器采集峰图,分别使用 In Vitro Diagnosis (IVD) MYLA 数据库 v2.0 和 Research Use Only (RUO) SARAMIS 数据库 v4.10 中的峰图比对得出鉴定结果及鉴定率,具体操作遵照仪器使用说明。IVD 判定标准:可信度为绿色方框(可信度 60.0%~99.9%)的为鉴定至种水平,黄色三角的为低分辨率,红色圆圈的为无鉴定结果。RUO 结果标识:深绿色(可信度 99.9%),浅绿色(可信度 90.0%~<99.9%),黄色(可信度 80.0%~<90.0%),白色(可信度 75.0%~<80.0%)和红色(结果有冲突/低分辨)。

1.3.3 Bruker MS 鉴定 操作过程与 Vitek MS 类似,但无固定校准位点。数据库为 Biotyper 3.1(DB 5989)。判定标准:鉴定分值 ≥ 2.0 为鉴定至种水平,1.7 $\leq$ 鉴定分值<2.0 为鉴定至属水平,鉴定分值<1.7的为无准确鉴定结果。由于一些菌株鉴定结果欠

佳,故拟通过自建库提高鉴定能力,分别选择 1 株希木龙念珠菌(12HX468)和 1 株假希木龙念珠菌(12PU491)建立数据库,菌株采用 Bruker MS 推荐的乙醇-甲酸-乙腈提取法,每株菌点 8 个靶位,每个靶点采集 3 张谱图,24 张峰图汇总为一个主要谱文件(MSP)置于数据库中。其余 43 株菌与自建库进行结果比对。

2 结 果

2.1.1 希木龙念珠菌原始鉴定结果 与分子生物学鉴定结果比较,希木龙念珠菌菌种鉴定准确率为 47.5%(19/40),1 株鉴定到菌属水平,20 株(50%,20/40)鉴定错误,其中 6 株鉴定为奥默毕赤酵母,6 株鉴定为新型隐球菌,见表 1。

2.1.2 假希木龙念珠菌原始鉴定结果 与分子生物学鉴定结果相比,常规鉴定方法无法鉴定假希木龙念珠菌。其中 1 株鉴定为希木龙念珠菌,其余 2 株分别鉴定为新型隐球菌和热带念珠菌,见表 1。

表 1 希木龙念珠菌复合体原始鉴定错误菌株

分子生物学鉴定结果	原始鉴定结果	菌株[n(%)]
希木龙念珠菌	奥默毕赤酵母	6(15.0)
希木龙念珠菌	新型隐球菌	6(15.0)
希木龙念珠菌	光滑念珠菌	5(12.5)
希木龙念珠菌	克柔念珠菌	1(2.5)
希木龙念珠菌	念珠菌属	1(2.5)
希木龙念珠菌	葡萄牙念珠菌	1(2.6)
希木龙念珠菌	清酒念珠菌	1(2.7)
假希木龙念珠菌	希木龙念珠菌	3(60.0)
假希木龙念珠菌	新型隐球菌	1(20.0)
假希木龙念珠菌	热带念珠菌	1(20.0)

2.2 MALDI-TOF MS 鉴定

2.2.1 希木龙念珠菌鉴定结果 与分子生物学鉴定结果相比,Vitek MS IVD2.0 对希木龙念珠菌的鉴定准确率为 100.0%,见表 2。而 Vitek MS RUO 数据库中无希木龙念珠菌,故无鉴定结果。Bruker MS DB 5989 对希木龙念珠菌的菌种鉴定准确率为 57.5%(23/40),菌属鉴定准确率为 27.5%(11/40),15.0%(6/40)菌株鉴定结果为希木龙念珠菌,但鉴定分值<1.70。见表 2。菌株 12HX468 自建库,其余 39 株菌质谱谱图与自建库比对,结果显示所有菌株均正确鉴定到种水平。

表 2 希木龙念珠菌 MALDI-TOF MS 鉴定结果

Vitek MS IVD2.0		Bruker MS DB 5989		Bruker MS 自建库	
可信度	n(%)	鉴定分值	n(%)	鉴定分值	n(%)
99.9%~100%	38(95)	≥2.000	23(57.5)	≥2.000	39(100)
99.0%~99.8%	2(5)	1.700~1.999	11(27.5)	—	—
—	—	<1.700	6(15)	—	—

注:—表示无数据

2.2.2 假希木龙念珠菌鉴定结果 由于 Vitek MS IVD 2.0 数据库中不含假希木龙念珠菌,故无法正确鉴定。5 株假希木龙念珠菌全部错误鉴定为希木龙念珠菌,且可信度>90%。Vitek MS RUO 数据库中无假希木龙念珠菌,故无鉴定结果。Bruker MS DB 5989 对假希木龙念珠菌的菌种鉴定准确率为 20.0%,菌属鉴定准确率为 80.0%,结果均为假希木龙念珠菌。菌株 12PU491 自建库,其余 4 株菌与自建库比对,结果显示所有菌株均正确鉴定到种水平。

3 讨 论

随着 IC 在院内感染的发病率不断上升以及致病菌菌种谱的变化,在临床工作中准确鉴定菌种并分析其流行病学特征日益重要。希木龙念珠菌复合体是引起人类感染的少见念珠菌种。1984 年首次从肾衰竭患者血中分离,该患者用两性霉素 B 和氟胞嘧啶治疗失败后死亡^[11]。此后,不断有希木龙念珠菌感染的报道,包括皮肤感染和侵袭性感染^[6]。在 ARTEMIS 全球真菌监测项目 10.5 年的研究中,希木龙念珠菌的分离率<0.01%,其中 11.1%的菌株对氟康唑和伏立康唑耐药^[12]。2012 年 CENDEJAS-BUENO 等^[7]利用 ITS 测序,发现希木龙念珠菌复合体包括 3 种菌,并且结果显示希木龙念珠菌与假希木龙念珠菌和耳念珠菌(*Candida auris*)难以区分。耳念珠菌是引起全球健康威胁的新发多重耐药念珠菌,引起多个国家住院患者严重感染^[13]。2017 年 3 月 16 日,美国疾病控制与预防中心(CDC)报道 53 名患者感染耳念珠菌,其呈现多重耐药的特征,造成的医院感染暴发引起关注,病死率高达 60%^[14]。我国于 2018 年 5 月首次报道了耳念珠菌感染病例^[15]。耳念珠菌常常被 Vitek 2 Compact 等传统方法错误鉴定为希木龙念珠菌^[16],二者系统发育和表型接近且均为多重耐药菌,因此,念珠菌菌种准确快速鉴定十分重要。目前,大多数的希木龙念珠菌报道来自巴西,包括 2 个当地的流行病学研究^[6,10]。虽然希木龙念珠菌复合体分离率低,但对唑类和两性霉素 B 的耐药率高。笔者前期研究表明,收集的所有希木龙念珠菌复合体(31 株)对氟康唑和两性霉素 B 耐药^[9],与之前巴西的研究结果一致^[6]。假希木龙念珠菌对两性霉素 B 的最小抑菌浓度高于希木龙念珠菌^[9],因此,有必要对希木龙念珠菌复合体中的菌种进行区分。希木龙念珠菌复合体准确的菌种鉴定依赖于分子生物学,传统方法常常将其鉴定错误。

ITS 测序视为酵母菌鉴定的“金标准”,但其操作复杂费时。MALDI-TOF MS 能够准确快速鉴定临床常见酵母菌,其鉴定准确率除受前处理、技术操作等影响外,主要依赖于质谱菌种鉴定数据库^[17]。因此,数据库中图谱的质量、数量都将直接影响鉴定的成功率与准确率。本研究表明 2 种 MALDI-TOF MS 系统均能较好鉴定希木龙念珠菌,但对假希木龙念珠菌

的鉴定能力有待进一步提高。由于病原微生物分布流行情况不同,并且数据库中常缺乏少见菌种的参考谱图,因此,实验室可在原有数据库基础上补充建立高质量的本地病原菌的质谱指纹图谱库,从而提高质谱的应用和鉴定成功率。

4 结 论

希木龙念珠菌复合体的准确鉴定对临床治疗十分重要,主要依赖于分子生物学方法。本研究率先在国内全面评估了 Vitek MS 与 Bruker MS 鉴定希木龙念珠菌复合体的性能,对于少见菌种的鉴定可通过增加数据库质谱谱图提高质谱的鉴定能力。

参考文献

- [1] KULLBERG B J, ARENDRUP M C. Invasive Candidiasis [J]. N Engl J Med, 2015, 373(15): 1445-1456.
- [2] PAPPAS P G, LIONAKIS M S, ARENDRUP M C, et al. Invasive candidiasis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 5(4): 18026.
- [3] XIAO M, SUN Z Y, KANG M, et al. Five-year national surveillance of invasive candidiasis: species distribution and azole susceptibility from the china hospital invasive fungal surveillance net (CHIF-NET) study[J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(7): e00577-00518.
- [4] CHEN S C, MARRIOTT D, PLAYFORD E G, et al. Candidaemia with uncommon Candida species: predisposing factors, outcome, antifungal susceptibility, and implications for management[J]. Clin Microbiol Infect, 2009, 15(7): 662-669.
- [5] FISHER M C, HAWKINS N J, SANGLARD D, et al. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security[J]. Science, 2018, 360(6390): 739-742.
- [6] RAMOS L S, FIGUEIREDO-CARVALHO M H, BARBEDO L S, et al. Candida haemulonii complex: species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil[J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(1): 111-115.
- [7] CENDEJAS-BUENO E, KOLECKA A, ALASTRUEY-IZQUIERDO A, et al. Reclassification of the Candida haemulonii complex as Candida haemulonii (C. haemulonii group I), C. duobushaemulonii sp. nov. (C. haemulonii group II), and C. haemulonii var. vulnera var. nov.: three multiresistant human pathogenic yeasts[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(11): 3641-3651.
- [8] RODERO L, CUENCA-ESTRELLA M, CORDOBA S, et al. Transient fungemia caused by an amphotericin B-resistant isolate of Candida haemulonii[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(6): 2266-2269.
- [9] HOU X, XIAO M, CHEN S C, et al. Candida haemulonii species complex: identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from a multi-center study in China[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(11): 2676.
- [10] DE ALMEIDA JN Jr, ASSY J G, LEVIN A S, et al. Candida haemulonii complex species, Brazil, January 2010 to March 2015[J]. Emerg Infect Dis, 2016, 22(3): 561-563.
- [11] LAVARDE V, DANIEL F, SAEZ H, et al. Peritonitis due to Torulopsis haemulonii[J]. Bull Soc Fr Mycol Med, 1984, 1(13): 173-176.
- [12] PFALLER M A, DIEKEMA D J, GIBBS D L, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of Candida species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1366-1377.
- [13] JEFFERY-SMITH A, TAORI S K, SCHELENZ S, et al. Candida auris: a review of the literature[J]. Clin Microbiol Rev, 2018, 31(1): e00029-17.
- [14] LARKIN E, HAGER C, CHANDRA J, et al. The emerging Candida auris: characterization of growth phenotype, virulence factors, antifungal activity, and effect of SCY-078, a novel glucan synthesis inhibitor, on growth morphology and biofilm formation [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(5): 396-416.
- [15] WANG X, BING J, ZHENG Q, et al. The first isolate of Candida auris in China: clinical and biological aspects[J]. Emerg Microbes Infect, 2018, 7(1): 93.
- [16] KATHURIA S, SINGH P K, SHARMA C, et al. Multi-drug-resistant Candida auris misidentified as Candida haemulonii: characterization by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and DNA sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by Vitek 2, CLSI broth microdilution, and E-test method[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(6): 1823-1830.
- [17] PINTO A, HALLIDAY C, ZAHRA M, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e25712.

(收稿日期: 2018-06-26 修回日期: 2018-09-28)