

• 论 著 •

MALDI-TOF MS 对新生隐球菌和格特隐球菌的快速鉴定与分析

吴思颖, 康梅[△], 刘雅, 肖玉玲, 何超, 谢轶, 马莹
(四川大学华西医院实验医学科, 四川成都 610041)

摘要:目的 利用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)快速鉴定新生隐球菌和格特隐球菌,并进一步对隐球菌不同基因型进行分析。**方法** 收集 2017 年 6 月至 2019 年 11 月该院分离的 44 株隐球菌。采用 URA5 基因 PCR 产物限制性片段长度多态性(URA5-RFLP)方法对 44 株隐球菌进行基因分型。应用 MALDI-TOF MS 对 44 株隐球菌进行鉴定,进一步使用 MALDI Biotype 软件对隐球菌临床株和基因分型标准菌株进行聚类分析。**结果** 44 株隐球菌临床株 URA5-RFLP 分型结果显示,42 株为新生隐球菌 VN I 型,1 株为格特隐球菌 VG I 型,1 株为格特隐球菌 VG II 型。MALDI-TOF MS 鉴定结果为 42 株新生隐球菌,2 株格特隐球菌,鉴定分值为 1.975~2.346 分,与分子生物学结果一致。新生隐球菌和格特隐球菌之间,以及新生隐球菌和格特隐球菌不同基因型之间,特征蛋白的质量和峰的信号强度存在差异。聚类分析发现新生隐球菌和格特隐球菌分别位于两个不同的集群,且新生隐球菌和格特隐球菌不同基因型被区分开。绝大多数新生隐球菌 VN I 型临床株与 VN I 型标准菌株位于同一集群,格特隐球菌 VG I 型和 VG II 型临床株分别与 VG I 型标准菌株和 VG II 型标准菌株位于同一集群。**结论** MALDI-TOF MS 可以快速、准确鉴定新生隐球菌和格特隐球菌,而且可作为一种潜在的分型方法对新生隐球菌和格特隐球菌不同基因型进行区分。

关键词:基质辅助激光解析电离飞行时间质谱; 新生隐球菌; 格特隐球菌; 分型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.14.009

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2020)14-1699-04

文献标识码:A

Rapid identification and analysis of MALDI-TOF MS for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*

WU Siying, KANG Mei[△], LIU Ya, XIAO Yuling, HE Chao, XIE Yi, MA Ying

(Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To use the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to rapidly identify *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* and further analyze their different genotypes. **Methods** A total of 44 strains of *Cryptococcus* spp. isolated in this hospital were collected from June 2017 to November 2019. The genotypes in these 44 strains of *Cryptococcus* spp. were determined by adopting the URA5-restriction fragment length polymorphism (URA5-RFLP). These 44 strains of *Cryptococcus* spp. were identified by using MALDI-TOF MS. The MALDI Biotype software was further used to conduct the clustering analysis on clinical strains of *Cryptococcus* spp. and genotyping standard strains. **Results** Among the 44 strains of *Cryptococcus* clinical isolates, the URA5-RFLP typing results showed that 42 strains were *C. neoformans* type VN I, 1 strain was *C. gattii* type VG I, and 1 strain was *C. gattii* type VG II. The MALDI-TOF MS identification results showed 42 strains of *C. neoformans* and 2 strains of *C. gattii* and the identification scores ranged 1.975–2.346 points, which was consistent with the results of molecular biology results. The specific protein mass and intensity of peaks were different between *C. neoformans* and *C. gattii*, also different between their different genotypes. The cluster analysis revealed that *C. neoformans* and *C. gattii* were located on two different clusters, moreover the different genotypes of *C. neoformans* and *C. gattii* were separated. The majority of *C. neoformans* clinical strains located on the same cluster with VN I standard strain. *C. gattii* VG I and VG II clinical strains were located on the same cluster with VG I standard strain and VG II standard strain, respectively. **Conclusion** MALDI-TOF MS can quickly and accurately identify *C. neoformans* and *C. gattii*, and can be used as a potential typing method to distinguish different genotypes of *C. neoformans* and *C. gattii*.

作者简介:吴思颖,女,技师,主要从事感染性疾病的实验室诊断研究。 [△] **通信作者,** E-mail: kangmei@sina.com。

本文引用格式:吴思颖,康梅,刘雅,等. MALDI-TOF MS 对新生隐球菌和格特隐球菌的快速鉴定与分析[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(14):1699-1702.

Key words: matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; cryptococcus neoformans; cryptococcus gattii; typing

隐球菌脑膜炎是由隐球菌引起的中枢神经系统感染,主要累及免疫功能受损人群,如人类免疫缺陷病毒(HIV)感染者和器官移植患者,也可引起免疫功能正常者的感染。中枢神经系统隐球菌病预后较差,病死率高,即使经过标准的抗真菌治疗,病死率仍可高达 60%^[1]。因此早期诊断和治疗尤为重要。常见的致病隐球菌主要包括新生隐球菌和格特隐球菌,主要包括 8 种基因型:新生隐球菌基因型 VN I~IV,格特隐球菌基因型 VG I~IV^[2]。隐球菌的传统鉴定方法主要依靠生化试验,但是该方法耗时长,缺乏及时性。分子生物学鉴定和分型方法成本较高且操作复杂,不适用于实验室常规检测。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)是分析非挥发性生物大分子的一种新型软电离质谱技术,可用于病原微生物的鉴定^[3]。由于其具有快速、灵敏、准确、高通量及自动化等特点,MALDI-TOF MS 已成为微生物鉴定领域非常重要的技术工具和手段。本研究应用 MALDI-TOF MS 对常见的致病隐球菌进行快速鉴定并进一步对隐球菌不同基因型进行聚类分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2017 年 6 月至 2019 年 11 月本院各科室分离的 44 株隐球菌临床株。

1.2 仪器与试剂 MALDI-TOF MS(Bruker Daltonik GmbH,德国),API 20C(bioMérieux,法国),PCR 扩增仪(ABI,美国),限制性内切酶 Sau96 I、Hha I(New England Biolabs,美国),Gel Doc XR 凝胶成像系统(BIO-RAD,美国)。沙氏琼脂平板(郑州安图), α -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA,Bruker Daltonik GmbH,德国),无水乙醇(成都科龙),三氟乙酸(MERCK 公司,德国),乙腈(Tedia 公司,美国),甲酸(Anaqua Chemicals Supply,美国)。

1.3 方法

1.3.1 隐球菌基因分型 利用 URA5 基因 PCR 产物限制性片段长度多态性(URA5-RFLP)方法对 44 株隐球菌临床株进行基因分型。PCR 扩增引物:URA5(5'-ATG TCC TCC CAA GCC CTC GAC TCC G-3'),SJ01(5'-TTA AGA CCT CTG AAC ACC GTA CTC-3')。PCR 扩增条件:94℃预变性 2 min,94℃变性 45 s,61℃退火 1 min,72℃延伸 2 min,35 个循环,最后 72℃延伸 10 min。使用 Sau96 I(10 U/ μ L)和 Hha I(20 U/ μ L)这两种限制性内切酶对上述 PCR 产物进行双酶切。将酶切体系于 37℃水浴 3 h,得到酶切产物。将临床株和标准菌株的酶切产物 10 μ L 于 2%的琼脂糖凝胶中 100 V 电泳 2.5 h,以 DL2000 作为分子量标记物,在 Gel Doc

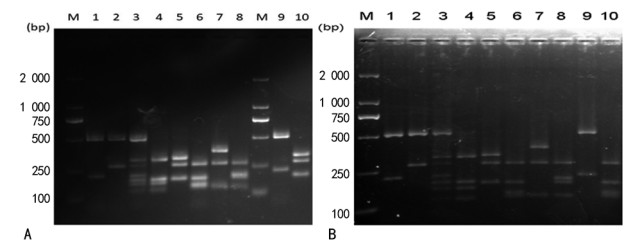
XR 凝胶成像系统中观察电泳结果,比较隐球菌临床株与 8 株不同基因型标准菌株的酶切谱型,得出隐球菌临床株的基因型。隐球菌基因分型标准菌株如下:WM148(VN I),WM626(VN II),WM628(VN III),WM629(VN IV),WM179(VG I),WM178(VG II),WM161(VG III)和 WM779(VG IV)。

1.3.2 MALDI-TOF MS 鉴定 MALDI-TOF MS 系统采用线性正性模式,采集相对分子质量为(2~20) $\times 10^3$ 的图谱。采用甲酸提取法,取待测菌株,加入 300 μ L 水、900 μ L 乙醇,混匀,加入 30 μ L 70%甲酸溶液,混匀后再加入 30 μ L 乙腈混匀,离心取 1 μ L 上清液在 MALDI 靶板上点样,晾干后添加 1 μ L HCCA,晾干。每个样本置于靶板上的 6 个不同位点,即每个样本生成 6 个合成的图谱(MSP)。将待鉴定隐球菌的质谱数据与数据库中参考菌株的数据进行比对,根据匹配程度得到相应分值,最终得到鉴定结果。得分 ≥ 2.0 表示鉴定到种水平,1.7~<2.0 表示鉴定到属水平,<1.7 表示不可信的鉴定结果。

1.3.3 聚类分析 使用 MALDI Biotype 软件对 44 株隐球菌临床株和 8 株基因分型标准菌株进行聚类分析,构建 MSP 聚类分析树状图。

2 结果

2.1 隐球菌基因分型结果 44 株隐球菌临床株 URA5-RFLP 分型结果显示,42 株为新生隐球菌 VN I 型,1 株为格特隐球菌 VG I 型,1 株为格特隐球菌 VG II 型。隐球菌基因分型结果见图 1。



注:A 和 B 为隐球菌基因分型标准菌株和部分临床株酶切产物电泳图;图 A 中 10 为格特隐球菌 VG I 型(临床株),9 为新生隐球菌 VN I 型(临床株);图 B 中 10 为格特隐球菌 VG II 型(临床株),9 为新生隐球菌 VN I 型(临床株);M 为标记物;1~4 分别为新生隐球菌基因型标准菌株 WM148(VN I)、WM626(VN II)、WM628(VN III)、WM629(VN IV);5~8 分别为格特隐球菌基因型标准菌株 WM179(VG I)、WM178(VG II)、WM161(VG III)、WM779(VG IV)。

图 1 隐球菌基因分型标准菌株和部分临床株 URA5-RFLP 分型结果

2.2 MALDI-TOF MS 鉴定结果 MALDI-TOF MS 对隐球菌标准菌株和临床株的鉴定结果与分子生物学鉴定结果完全一致。42 株隐球菌临床株鉴定为新生隐球菌,另外 2 株鉴定为格特隐球菌,鉴定结果得分为 1.975~2.346 分。标准菌株的鉴定得分如下,

WM148:2.109 分;WM626:2.059 分;WM628:2.134 分;WM629:2.045 分;WM179:2.041 分;WM178:2.210 分;WM161:2.051 分;WM779:1.969。

2.3 新生隐球菌和格特隐球菌以及不同基因型之间质谱图的特点 新生隐球菌和格特隐球菌之间,以及新生隐球菌和格特隐球菌不同基因型之间,特征蛋白的质量和峰的信号强度存在差异。新生隐球菌 VN II 型标准菌株 WM626 在 8 000~1 000 m/z 有 2 个明显的质谱峰,而新生隐球菌其他基因型却不明显。格特隐球菌 VG I 型标准菌株 WM179 在 5 000~6 000 m/z 有 1 个明显的质谱峰。所有新生隐球菌临床株的质谱图与 VN I 型标准菌株 WM148 更接近。格特

隐球菌 VG I 型临床株(F14)的质谱图与 VG I 型标准菌株 WM179 更相似。格特隐球菌 VG II 型临床株(F44)的质谱图与 VG II 型标准菌株 WM178 更接近。

2.4 聚类分析 对所有隐球菌临床株和基因分型标准菌株进行聚类分析,得到 MSP 聚类分析树状图。从图中可以看到,新生隐球菌和格特隐球菌分别位于两个不同的集群,且新生隐球菌和格特隐球菌不同基因型被区分开。绝大多数新生隐球菌 VN I 型临床株与 VN I 型标准菌株 WM148 位于同一集群,格特隐球菌 VG I 型和 VG II 型临床株分别与 VG I 型标准菌株 WM179 和 VG II 型标准菌株 WM178 位于同一集群。见图 2。

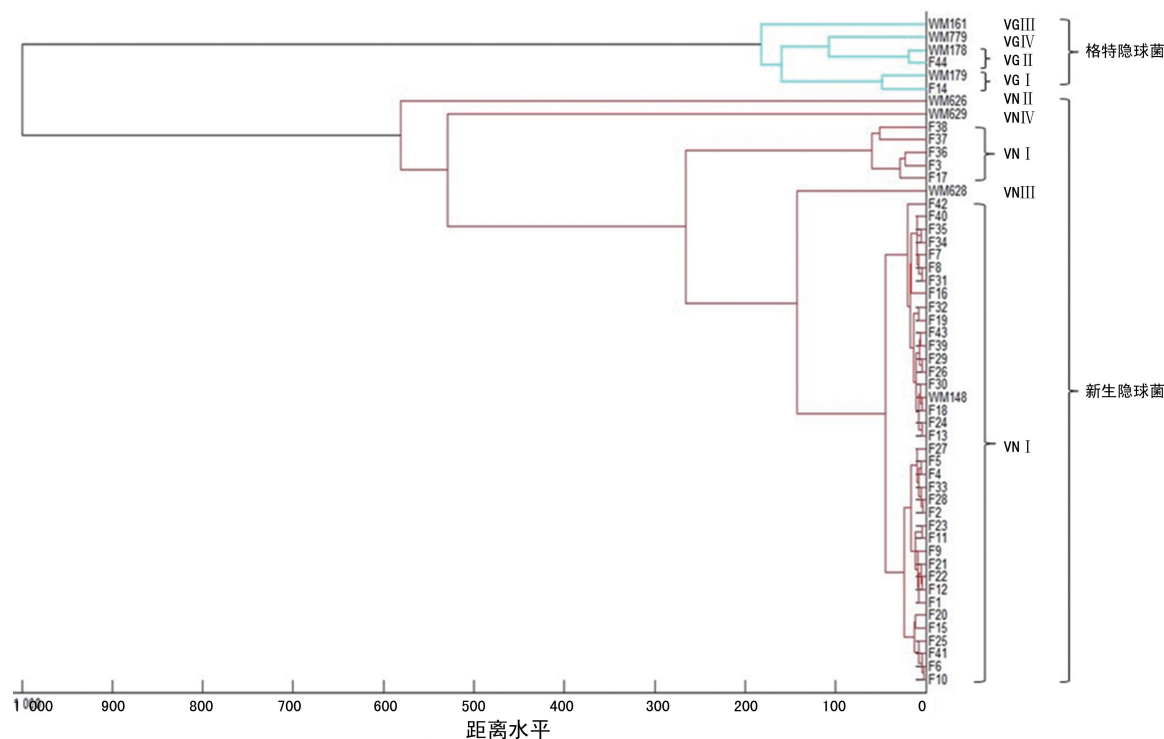


图 2 44 株隐球菌临床株和 8 株基因分型标准菌株 MSP 聚类分析树状图

3 讨 论

临床实验室中隐球菌的传统鉴定方法主要依靠生化试验和形态学检查,但均不能区分新生隐球菌和格特隐球菌,而两者所致感染在临床表现、体外药敏试验和治疗预后等方面均存在明显差异^[4]。分子生物学分型方法如限制性片段长度多态性(RFLP)、扩增片段长度多态性(AFLP)和多位点或全基因组序列分析等,由于价格昂贵,操作较烦琐,往往局限在参考实验室,目前未在临床常规使用^[5]。MALDI-TOF MS 具有经济、操作简单的特点,可快速为临床提供检测结果,使患者得到即时的治疗。本研究应用 MALDI-TOF MS 对隐球菌临床株和标准菌株进行快速鉴定,结果显示 44 株隐球菌临床株和 8 株基因分型标准菌株的鉴定结果与分子生物学鉴定结果一致,可准确区分新生隐球菌和格特隐球菌。刘涛华等^[6]对 20

株隐球菌的研究发现,MALDI-TOF MS 可作为隐球菌属分类鉴别中有效的辅助手段,相比于多位点序列分析技术,MALDI-TOF MS 更为快捷。ZHANG 等^[7]研究发现,MALDI-TOF MS 对新生隐球菌的鉴定具有 100% 的准确性,但唯一 1 株格特隐球菌被错误鉴定为新生隐球菌。由于国内的隐球菌感染主要以新生隐球菌为主,格特隐球菌属于散发病例,因此还需收集更多的格特隐球菌以评价 MALDI-TOF MS 对格特隐球菌的鉴定能力。黄声雷等^[8]对两种 MALDI-TOF MS 系统进行了评价,对于常见的非白色念珠菌,Autoflex MALDI-TOF MS 系统鉴定准确性优于 Vitek MALDI-TOF MS 系统。对于隐球菌的鉴定,Autoflex MALDI-TOF MS 系统是否优于 Vitek MALDI-TOF MS 系统,尚需进一步研究。

MALDI-TOF MS 不仅能用于病原微生物的鉴

定,而且还具有分型能力,可进一步应用于病原微生物的分型。例如 MALDI-TOF MS 应用于弗劳地枸橼酸杆菌和黏质沙雷菌的分型,其结果与全基因组序列分析具有较好的一致性^[9]。基于 MALDI-TOF MS 的聚类分析可对哈维弧菌进行溯源性分析^[10]。MALDI-TOF MS 也可用于真菌的分型。CHAO 等^[11]利用 MALDI-TOF MS 聚类分析可区分皱褶假丝酵母菌复合体中的发酵假丝酵母菌和季也蒙假丝酵母菌。FIRACATIVE 等^[12]研究发现,新生隐球菌和格特隐球菌不同基因型之间的质谱峰图存在差异,聚类分析发现新生隐球菌与格特隐球菌不同基因型分别位于不同的集群,相同基因型则位于同一集群。POSTERARO 等^[13]运用 MALDI-TOF MS 对 82 株隐球菌(72 株新生隐球菌、10 株格特隐球菌)进行聚类分析,其中 81 株(98.8%)被准确归于相应的基因型,仅 1 株 VG II 型格特隐球菌被错误地归于 VG I 集群。SIQUEIRA 等^[14]纳入隐球菌不同基因型建立数据库,进一步评估该数据库用于区分新生隐球菌和格特隐球菌不同基因型的能力,结果显示该数据库可对所有新生隐球菌和格特隐球菌基因型进行正确鉴定。本研究中隐球菌临床株和不同基因型的标准菌株聚类分析发现,绝大多数 VN I 型临床株与 VN I 型标准菌株位于同一集群,仅少数 VN I 型临床株位于另一集群。推测基于 MALDI-TOF MS 的聚类分析可能会受到样品蛋白制备以及菌株蛋白表达量的影响。在进行分型或亚种水平鉴定时,需要识别更多的具有重现性的质谱峰,需要设置更多的平行组。此外,对未知病原菌的分型鉴定必须要有足够多的已知菌株的数据库,方可实现最佳匹配,提高其鉴定分型能力^[15]。本研究中 44 株经过分子生物学确认基因型的隐球菌已经全部纳入数据库中。由于本研究中所有新生隐球菌临床株均为 VN I 型,且只有 2 株格特隐球菌,应该纳入更多隐球菌基因型以评价 MALDI-TOF MS 对隐球菌的分型能力。

4 结 论

综上所述,MALDI-TOF MS 作为一种快速的鉴定方法可以准确区分新生隐球菌和格特隐球菌,且可作为一种潜在的分型方法对新生隐球菌和格特隐球菌不同基因型进行区分。

参考文献

[1] RAJASINGHAM R, WAKE R M, BEYENE T, et al. Cryptococcal meningitis diagnostics and screening in the era of point-of-care laboratory testing[J]. J Clin Microbiol, 2019, 57(1): e01218-e01238.

[2] HAGEN F, KHAYHAN K, THEELEN B, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex[J]. Fung Genetics Biol, 2015, 78: 16-48.

[3] 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.

[4] DEL POETA M, CASADEVALL A. Ten challenges on cryptococcus and cryptococcosis [J]. Mycopathologia, 2012, 173(5/6): 303-310.

[5] HAGEN F, HUIJSMANS A, KLAASSEN C H, et al. MALDI-TOF based identification of the pathogenic yeast species *C. neoformans* and *C. gattii*[J]. Mycoses, 2011, 54: 78-79.

[6] 刘涛华,王颜颜,吕倩,等. D1/D2、MLST 及 MALDI-TOF MS 在新生隐球菌分类中的应用[J]. 贵阳医学院学报, 2016, 41(2): 139-144.

[7] ZHANG L, XIAO M, WANG H, et al. Yeast identification algorithm based on use of the Vitek MS system selectively supplemented with ribosomal DNA sequencing: proposal of a reference assay for invasive fungal surveillance programs in China[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(2): 572-577.

[8] 黄声雷,胡必杰,陈蓉,等. 两种 MALDI-TOF MS 系统快速鉴定血培养中白念珠菌以外酵母样真菌[J]. 检验医学, 2015, 30(2): 128-131.

[9] RODEL J, MELLMANN A, STEIN C, et al. Use of MALDI-TOF mass spectrometry to detect nosocomial outbreaks of *Serratia marcescens* and *Citrobacter freundii* [J]. Euro J Clin Microbiol Infect Dis, 2019, 38(3): 581-591.

[10] 武静,陈英剑,李继霞,等. MALDI-TOF-MS 检测哈维弧菌前处理条件的探索及聚类分析[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(1): 14-17.

[11] CHAO Q T, LEE T F, TENG S H, et al. Comparison of the accuracy of two conventional phenotypic methods and two MALDI-TOF MS systems with that of DNA sequencing analysis for correctly identifying clinically encountered yeasts[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e109376.

[12] FIRACATIVE C, TRILLES L, MEYER W. MALDI-TOF MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37566.

[13] POSTERARO B, VELLA A, COGLIATI M, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for discrimination between molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(7): 2472-2476.

[14] SIQUEIRA L, GIMENES V, DE FREITAS R S, et al. Evaluation of vitek MS for differentiation of cryptococcus neoformans and cryptococcus gattii genotypes[J]. J Clin Microbiol, 2019, 57(1): e01218-e01282.

[15] 秦娟秀,李敏. MALDI-TOF MS 指纹图谱技术在病原微生物分型中的应用前景[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(6): 367-369.