

MALDI-TOF-MS 技术快速鉴定临床酵母样真菌的应用评价*

梁 铮¹, 柏彩英², 罗娅莎¹, 张 文¹, 蓝 锴¹, 李苗苗³, 周 强^{1△} (1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510120; 2. 广东省妇幼保健院检验科, 广州 510010; 3. 广东医学院, 广州 523808)

【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)在快速鉴定临床分离的酵母样真菌中的应用价值。**方法** 收集临床分离的酵母样真菌 135 株, 分别用 VITEK MS、API20C 和 CHROMagar 显色培养基同时进行鉴定与比较, χ^2 检验分析 VITEK MS 和 API 及显色培养基鉴定结果的准确率, 以真菌内转录间隔区(ITS)基因测序作为鉴定结果的金标准, 同时比较各种方法在临床使用中的优缺点。**结果** VITEK MS、API20C 和显色培养基鉴定的准确率分别为 98.5%(133/135)、78.5%(106/135)、59.3%(80/135), 经 χ^2 检验分析, 差异有统计学意义($\chi^2=51.996, P<0.05$)。**结论** MALDI-TOF-MS 可将酵母样真菌快速、准确地鉴定到种。

【关键词】 酵母样真菌; MALDI-TOF-MS 质谱分析; ITS 基因测序

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.18.005 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)18-2659-02

Application evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of clinically isolated yeast-like fungi* LIANG Zheng¹, BO Cai-ying², LUO Ya-sha¹, ZHANG Wen¹, LAN Kai¹, LI Miao-miao³, Zhou Qiang^{1△} (1. Second Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510120, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Municipal Maternal and Child Health Care Hospital, Guangzhou, Guangdong 510010, China; 3. Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 523808, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the application value of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry(MALDI-TOF-MS) for rapid identification of clinically isolated yeast-like fungi. **Methods** 135 strains of clinically isolated yeast-like fungi were collected and identified by VITEK MS, API20C system and CHROMagar Candida at the same time, then the detection results were compared, the accuracy of detected results were analyzed by the χ^2 test, the identification of the ITS gene sequence of these isolates were taken as the gold standard. At the same time the advantages and disadvantages in the clinical application of these methods were compared. **Results** The identification accuracy rates of VITEK MS, API20C and CHROMagar Candida were 98.5%(133/135), 78.5%(106/135) and 59.3%(80/135) respectively, the differences were statistically significant ($\chi^2=51.996, P<0.05$). **Conclusion** MALDI-TOF-MS could rapidly and accurately identify yeast-like fungi.

【Key words】 yeast-like fungi; MALDI-TOF-MS; ITS gene sequencing

近年来,深部真菌感染发生率和病死率在逐年增加^[1],其中以白色假丝酵母为主,其他酵母菌样真菌也频繁被检出。传统的真菌鉴定方法主要有 CHROMagar 显色培养基和生化鉴定系统如 API20C、全自动微生物鉴定仪 Vitek、Microscan 及 Biolog 鉴定系统等,这些检测需较长周期和较高成本,难以鉴定不常见或生化反应相近的真菌;分子学鉴定方法(如荧光杂交和 PCR)快速、准确,但对实验室要求较高,难进行推广。基质辅助激光解析/电离-飞行时间质谱分析(MALDI-TOF-MS)是应用于病原微生物快速检测的一项新技术,不同的病原菌经 MALDI-TOF-MS 检测可以形成特异性的指纹图谱,将待测病原菌的质谱图与已有质谱图库进行比较,即可确定病原菌种属,拥有快速、稳定、重复性好等特点,本文将探讨法国生物梅里埃 VITEK MS 质谱仪在临床酵母样真菌快速鉴定中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 试验菌株 收集分离自广州中医药大学第二临床医学院

2014 年 3~12 月临床痰、尿液、分泌物、皮肤刮取物、骨髓等标本的酵母样真菌 135 株,通过真菌内转录间隔区(ITS)序列分析确定菌种分布如下:近平滑假丝酵母菌 17 株,白色假丝酵母菌 32 株,光滑假丝酵母菌 22 株,热带假丝酵母菌 21 株,克柔假丝酵母菌 16 株,季也蒙假丝酵母菌 9 株,皱褶假丝酵母菌 4 株,阿萨假丝酵母菌 7 株,红酵母菌 2 株,新型隐球菌 3 株,季也蒙毕赤酵母 2 株,标本用真菌滤纸保藏法(载体保藏法)-80℃冷冻保存。

1.2 试剂与仪器 酵母基因组 DNA 提取液、PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司),API20C 系统酵母菌鉴定试剂盒,CHROMagar 显色培养基, VITEK MS(Biomerieux),PCR 仪(ABI9700),水平电泳仪及凝胶成像分析系统(BIO-RAD)等。

1.3 方法

1.3.1 显色培养基鉴定 按临床常规的表型鉴定流程,沙氏培养基上培养所得真菌菌株均进行菌落形态及镜下形态观察,

* 基金项目:广东省科技计划项目(2011B031800028);广东省科技计划项目(粤科社字[2011]106 号)。 作者简介:梁铮,男,硕士,主管技师,主要从事微生物耐药机制研究。 △ 通讯作者, E-mail: zq_zhouqiang@163.com。

酵母菌行显色培养基培养,根据菌落颜色判定。

1.3.2 API20C 鉴定 按照试剂盒说明书进行操作。

1.3.3 VITEK MS 鉴定 在 VITEK MS 标本准备工作站,按标准操作规程完成标本准备工作;待所有标本准备完成或整块靶板点位涂满菌,放进检测口检测;检测结束进入 MYLA 软件对质谱图行进行鉴定。

1.3.4 ITS 测序 提取 135 株菌株的 DNA,扩增其 ITS 基因,回收 PCR 阳性产物进行测序,具体方法参看文献[2-3]。测序结果通过 BLAST 检索与 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)比对,找出与之相似的序列,序列同源性不低于 97% 确定为同属,同源性不低于 99% 视为同种^[4]。

1.4 统计学处理 使用 SPSS13.0 软件进行统计分析。计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 种方法准确率的比较 VITEK MS、API20C 和显色培养 3 种方法鉴定结果的准确率分别为 98.5%(133/135)、78.5%(106/135)和 59.3%(80/135),经 χ^2 分析差异有统计学意义($\chi^2=51.996, P<0.05$),VITEK MS 与 API20C 两组组间比较同样具有统计学意义($\chi^2=26.566, P<0.05$)。

2.2 VITEK MS、API20C 鉴定结果不同菌株的分析 MS 与 API 鉴定结果共有 25 株菌不一致,API 对光滑与近平滑假丝酵母菌,季也蒙假丝酵母菌与新型隐球菌的鉴定有较高的错判率。见表 1。

表 1 VITEK MS、API20C 鉴定结果不一致真菌

测序结果	Vitek MS 鉴定	API20C 鉴定	数量(<i>n</i>)
皱褶丝酵母菌	皱褶丝酵母菌	未鉴定出	2
季也蒙毕赤酵母	季也蒙假丝酵母菌	未鉴定出	2
季也蒙假丝酵母菌	季也蒙假丝酵母菌	新型隐球菌	2
新型隐球菌	新型隐球菌	季也蒙假丝酵母菌	2
热带假丝酵母菌	热带假丝酵母菌	白色假丝酵母菌	2
红酵母菌	红酵母菌	皱褶丝酵母菌	1
光滑假丝酵母菌	光滑假丝酵母菌	近平滑假丝酵母菌	2
近平滑假丝酵母菌	近平滑假丝酵母菌	(1)光滑假丝酵母菌	3
		(2)热带假丝酵母菌	1
阿萨丝酵母菌	阿萨丝酵母菌	(1)无名酵母菌	3
		(2)克柔假丝酵母菌	1
克柔假丝酵母菌	克柔假丝酵母菌	(1)白色假丝酵母菌	3
		(2)光滑假丝酵母菌	1

2.3 3 种方法临床应用特点的比较 VITEK MS、API20C、显色培养 3 种鉴定方法在临床鉴定中所需时间,经济成本,结果判读等特点的比较见表 2。

表 2 VITEK MS、API20C、显色培养 3 种鉴定方法

临床应用特点的比较

方法	特殊仪器	所需时间*	结果判读	操作方法	单次检测成本
VITEK MS	需要	1~2 min	自动判读	简单	相对较低
API20C	需要	48~72 h	肉眼判读	较复杂	较低
显色培养	不需要	24~48 h	肉眼判读	简单	最低

注: * 所需时间指菌落长出后至鉴定出结果所需时间。

3 讨 论

本试验收集的 135 株酵母样真菌中使用 VITEK MS 方法成功鉴定了 133 株,正确率 98.5% 与国外文献报道(92.5%~99.0%)接近^[5],明显高于 API20C(78.5%)和显色培养鉴定法(59.3%);2 株菌未成功鉴定的真菌 ITS 测序结果为季也蒙毕赤酵母,MS 鉴定为季也蒙假丝酵母菌,前者实则是后者的有性期阶段。试验数据表明 VITEK MS 能快速、准确、稳定地鉴定临床分离的酵母样真菌。

传统的生物表型鉴定方法虽能准确鉴定大部分的酵母菌,但不常见的菌株则可能鉴定失败^[6]。显色培养基一般可鉴定 4 种常见酵母菌,但不同人在颜色辨别上存在一定差异或显色不典型容易造成鉴定错误,本试验数据表明显色培养正确率明显低于 MS 和 API,其中有 1 株光滑念珠菌显为蓝灰色(典型的显色为紫色)。API20C 试验对光滑与近平滑假丝酵母菌,季也蒙假丝酵母菌与新型隐球菌的鉴定有较高的错判率,对阿萨丝酵母菌、克柔假丝酵母菌也出现错误鉴定。而克柔假丝酵母菌对氟康唑天然耐药,因此 API 鉴定结果为克柔假丝酵母菌时应结合其他方法确认,以免误导治疗。在本次试验中 API20C 鉴定正确率 78.5%,明显低于国内、国外文献报道^[2,7-8],原因可能是板条浊度判读结果依赖于操作人员熟练程度和所研究菌种构成比等因素导致了研究结果的差异,这也反映了该方法在结果判读方面不够客观,易造成误判。

从临床应用的情况分析,VITEK MS 操作简单,实验准备时间和出报告的时间较短,单次检测的成本较低,仪器自动判读结果人为因素影响较少。综合各方面因素,VITEK MS 能满足临床微生物实验室快速、准确鉴定病原体的需求。在一些研究中,VITEK MS 不能正确地鉴定菌株是因为数据库中标准菌株的图谱有限或菌库尚未包含这些菌株,质谱峰数据不充分导致得分较低。随着该技术的广泛应用,质谱图库数据将会得到进一步的补充,可使鉴定结果更加准确、可靠。

参考文献

[1] 李云,李忠涛,夏正武,等. 呼吸道真菌感染的流行病学调查及耐药性检测分析[J]. 实用预防医学,2012,19(4): 591-593.

[2] 陈中举,孙自镛,李丽,等. 应用 rDNA ITS 区测序评估 API20C AUX 及 CHROMagar 对酵母菌的鉴定[J]. 现代检验医学杂志,2013,28(5):68-70.

[3] Giebel R, Worden C, Rust SM, et al. Microbial fingerprinting using Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry(MALDI-TOF MS) applications and challenges[J]. Adv Appl Microbiol, 2010, 71: 149-184.

[4] Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, et al. Sequence-based identification of Aspergillus, fusarium, and mucorales species in the clinical mycology laboratory; where are we and where should we go from here[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(4): 877-884.

[5] Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, et al. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(9): 1359-1365.

[6] Yong PV. Molecular identification of(下转第 2663 页)

管的凝集情况,并与对照管相比较。根据底部凝集物和凝集颗粒的松软度、大小、均匀度等性状及上清液的混浊程度,凝集程度通常以“++++”“+++”“++”“+”符号记录。伤寒沙门菌“O”抗原凝集物呈颗粒状沉于管底,轻摇时不易散开,黏于管底,“H”抗原凝集物呈絮状,疏松而大块地沉于管底,轻摇易离散。本次制备的伤寒诊断抗血清试管凝集效价为 1:1 280。见表 4。

表 4 试管凝集测定血清效价结果

试管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
最终稀释度	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1 280	1:2 560	—
凝集程度	++++	++++	+++	+++	++	++	++	+	—

注:—表示无数据。

表 5 间接凝集测定血清效价结果

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
最终稀释度	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1 280	1:2 560	—
凝集程度	++++	++++	+++	+++	++	++	+	+	—

注:—表示无数据。

3 讨 论

3.1 本次免疫血清的制备是一连续性、综合性、系统性实验,本实验采用伤寒杆菌“O”和“H”标准菌液直接作为抗原免疫家兔,方法操作简单,避免了抗原制备的繁杂程序,从实验结果分析,本次制备的伤寒诊断免疫血清试管凝集效价为 1:1 280,间接凝集效价为 1:640,本次实验获得的抗血清效价较高,整个实验方案从免疫原的制备,动物的饲养,免疫程序的制定与实施,动物的采血,一直到抗血清的鉴定、保存。在整个实验过程中实验者既学习了自制抗血清的方法,又使实验者在理论上可印证抗原刺激机体产生免疫应答的过程,对抗原、抗体等抽象的概念得以直观理解,从实验角度包括了动物实验技术、抗原的制备、凝集反应等重要的免疫学技术。同时还能充分调动学习者的积极性和主动性,培养实验者分析问题和解决问题的能力,增强实验者创新思维、动手能力及加强实验者的团队协作能力^[7-8]。

3.2 将适当的颗粒性抗原物质(如细菌、红细胞等)反复多次注射到动物体内,使之产生免疫应答,经过一段时间动物血清中出现大量特异性抗体,这种含抗体的血清称为抗血清(或免疫血清)。免疫血清是经过抗原免疫动物的血清,含有特异性免疫球蛋白。它不仅在病原生物学、免疫学检验方面应用十分广泛,而且是一种非常重要的生物制品,大量用于病原体诊断与感染性疾病的紧急预防和治疗^[9]。

3.3 通过本次实验的设计及实验过程和结果来看,在 1 个月内制备的兔抗伤寒免疫血清,具有免疫时间短,整个实验过程操作简单易行,效价高,成本低,并将收集的抗血清作为诊断试剂随后应用于凝集反应、肥达反应等免疫学检验实验教学中,

2.3 间接凝集实验测定血清效价结果 先观察生理盐水对照孔,红细胞集中沉积孔底,呈一小圆点,边缘整齐,不发生凝集为阴性。然后自第 1 孔开始观察孔内液体的浑浊程度及孔底凝集块的大小。若红细胞凝集,则均匀分布于孔底周围,可根据红细胞凝集程度判断阳性反应的强弱,以出现“++”凝集的最高稀释度为血清中抗体的凝集效价。本次制备的伤寒诊断抗血清间接凝集效价为 1:640。见表 5。

实验效果明显,达到了实验教学的要求,是高校免疫学检验教学中制备免疫血清简便、实用的方法。

参考文献

[1] 孙向彬. 制备高效价细菌免疫血清应重视的几个因素[J]. 农垦医学,2005,27(3):244-245.

[2] 邵长玲,孔军伶. 制备免疫血清免疫法改良和效果[J]. 卫生职业教育,2011,29(9):111-112.

[3] 陶永平. 短程免疫方案制备抗血清的效价观察[J]. 山西医药杂志,2013,42(5):514-515.

[4] 陈小挺,樊娟娟,张玲娇,等. 实验教学中颗粒性抗原与可溶性抗原制备抗血清的方法及其应用[J]. 健康研究,2010,30(1):15-17.

[5] 吴震杰,蔡玲斐,王金鑫,等. 不同免疫程序制备伤寒抗血清的效价比较[J]. 杭州师范学院学报:医学版,2007,27(5):317-318.

[6] 王娅,王金勇,王淑兰. 伤寒、副伤寒免疫血清的制备[J]. 数理医药学杂志,2005,18(2):178-179.

[7] 陈建芳,高静,于桂霞. 开展免疫学综合设计性实验的探索[J]. 中国医学创新,2010,7(24):172-173.

[8] 侯晋,周烨,刘星光,等. 文献汇报在医学免疫学教学中的实践和探讨[J]. 基础医学教育,2011,13(11):969-971.

[9] 刘辉. 临床免疫学和免疫检验实验指导[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2009:1.

(收稿日期:2015-03-25 修回日期:2015-04-21)

(上接第 2660 页)

Candida orthopsilosis isolated from blood culture[J]. Mycopathologia,2008,165(2):81-87.

[7] 金云,等. API20C 和科玛嘉显色培养基鉴定酵母菌的比较[J]. 实验与检验医学,2010,28(5):497-498.

[8] Silva JO, Candido RC. Evaluation of the API20C AUX system for the identification of clinically important yeasts [J]. Rev Soc Brasil Med Trop,2005,38(3):261-263.

(收稿日期:2015-04-15 修回日期:2015-05-15)