

· 论 著 ·

## MALDI-TOF 质谱仪进行临床酵母菌鉴定的方法学评价

李艳君,董 蓉,赵强元<sup>△</sup>

(中国人民解放军海军总医院检验科,北京 100048)

**摘要:**目的 探讨 MALDI-TOF 质谱仪用于临床酵母菌鉴定的优越性,为临床真菌感染提供早期诊断、治疗的依据。方法 收集该院 2015 年 8 月至 2016 年 3 月临床分离酵母菌 206 株,分别用 MALDI-TOF 质谱仪、VITEK2 Compact 微生物鉴定仪和显色培养法进行鉴定,以内转录间区序列测序结果为最终确认结果。比较 MALDI-TOF 质谱仪、VITEK2 Compact 微生物鉴定仪和显色培养法鉴定的准确性。结果 3 种方法鉴定酵母菌的准确率分别为 VITEK2 Compact 鉴定仪 82.5%,显色培养法 67.0%,MALDI-TOF 质谱仪 92.7%。MALDI-TOF 质谱仪与 VITEK2 Compact 鉴定仪比较,差异有统计学意义( $P=0.006$ ),MALDI-TOF 质谱仪与显色培养法比较,差异有统计学意义( $P=0.001$ )。结论 MALDI-TOF 质谱仪与 VITEK2 Compact 鉴定仪、显色培养法相比,具有快速、操作简便、结果准确等优点。

**关键词:** MALDI-TOF 质谱仪; 酵母菌; 内转录间区测序

**DOI:** 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.17.010 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2017)17-2523-03

## Methodological evaluation of MALDI-TOF MS for conducting identification of clinically isolated yeast

LI Yanjun, DONG Rong, ZHAO Qiangyuan<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, Navy General Hospital, Beijing 100048, China)

**Abstract:** **Objective** To probe into the superiority of MALDI-TOF MS in the identification of clinical yeast to provide the basis for early diagnosis and treatment of clinical fungal infection. **Methods** A total of 206 strains of yeast clinically isolated in our hospital from August 2015 to March 2016 were collected and identified with MALDI-TOF mass spectrometer, VITEK2 compact microbial analyzer and chromogenic culture respectively. The ITS sequencing results were used as the final confirmation one. The accuracies of identifying yeast were compared among these 3 kinds of method. **Results** The accuracy rates of 3 kinds of method for identifying yeast were 82.5% for VITEK2 Compact, 67.0% for chromogenic method and 92.7% for MALDI-TOF mass spectrometry. The difference between MALDI-TOF and VITEK2 compact was statistically significant ( $P=0.006$ ), and the difference between MALDI-TOF and chromogenic method was statistically significant ( $P=0.001$ ). **Conclusion** Compared with the VITEK2 Compact microbial analyzer and the color developing method, the MALDI-TOF mass spectrometer has the advantages of rapidness, simple operation, accurate results and so on.

**Key words:** MALDI-TOF MS; yeast; ITS sequencing

近年来,由于广谱抗菌药物、免疫抑制剂、糖皮质激素等药物的广泛应用和因器官移植、肿瘤化疗等造成免疫损伤患者的增多,真菌感染呈持续性上升趋势。尤其是近几年,白色假丝酵母菌感染占血源性真菌感染的半数以上,其病死率高达 45%~75%,非白色假丝酵母菌的感染比例也在升高<sup>[1]</sup>。因此,真菌的早期诊断和治疗,对于提高患者治愈率,降低病死率具有一定的临床意义。然而,对于酵母菌的鉴定,传统上多采用基于生化反应和显色培养的方法,两种方法在酵母菌的鉴定中都存在耗时长、鉴定能力不足等问题。近年来随着微生物鉴定技术的飞速发展, MALDI-TOF 质谱仪应运而生,在临床感染病原菌的鉴定中应用日益广泛。许多报道显示其在多种细菌的鉴定中与传统方法相比,具有快速、准确的特点,但在真菌中的研究还鲜有报道。因此,本研究探讨了 MALDI-TOF 质谱仪用于临床常规酵母菌鉴定的优越性,为临床真菌感染提供早期诊断、治疗的依据。现报道如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 菌株来源** 收集本院 2015 年 8 月至 2016 年 3 月临床分离酵母菌 206 株。菌株来源于血液、痰液、尿液、分泌物、脓汁、脑脊液、粪便和伤口拭子等。

**1.2 仪器与试剂** 主要仪器与试剂包括 MALDI-TOF 质谱

仪及配套基质液(布鲁克公司)、VITEK2 Compact 全自动微生物鉴定仪及 YST 鉴定卡(法国梅里埃公司)、Chromagar 显色培养基(法国科马嘉公司)、沙堡弱琼脂培养基(法国梅里埃公司)、酵母基因组 DNA 提取试剂盒及聚合酶链反应(PCR)相关试剂(Qiagen 公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 真菌分离培养** 所有菌株标本均接种在沙堡弱琼脂培养基上,于 28℃ 培养箱恒温培养 2~3 d,每天观察菌株生长情况及菌落形态,长出单个菌落后对菌落进行次代纯培养。

**1.3.2 VITEK2 Compact 鉴定仪** 对纯培养菌株进行革兰染色,明确其为酵母菌,挑取纯培养菌落,用 0.45% 无菌氯化钠溶液配制成麦氏浊度为 1.8~2.2 的菌悬液,装载卡片上机鉴定,18~24 h 记录实验结果。

**1.3.3 显色培养鉴定** 将纯培养菌株接种在 Chromagar 显色培养基,25~30℃ 培养 48 h 观察菌落的颜色,进行菌种鉴定,其判定方法见表 1。

**1.3.4 MALDI-TOF 质谱仪** 根据 MALDI-TOF 质谱仪标准操作流程,取甲酸萃取法制备的标本 1 μL,加 1 μL 基质液,自然晾干后上机测定。MALDI-TOF 质谱仪结果判读:根据 Biotyper 软件得分标准(>2.0 的菌株在“种”水平上的鉴定被完

全接受;得分在 1.8~2.0 的菌株在“种”水平上的鉴定已经足够准确;得分>1.7 菌株在“属”的水平上被接受,记录鉴定结果。

表 1 显色培养结果判定表

初筛假丝酵母菌属	菌落颜色及直径
白色假丝酵母菌	绿色、翠绿色(直径约 2 mm)
热带假丝酵母菌	蓝灰色、铁蓝色(直径约 1.5 mm)
克柔假丝酵母菌	粉红色(模糊、有微毛,菌落较大,直径 4~5 mm)
光滑假丝酵母菌	紫色(直径约 2 mm)
其他假丝酵母菌	白色

**1.3.5 内转录间区(ITS)序列测序** 真菌 DNA 通过酵母基因组 DNA 提取试剂盒(Qiagen 公司)提取,PCR 扩增引物、反应条件及反应体系见参考文献[2]。扩增引物为 ITS3(5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GA-3')和 ITS4(5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3')。PCR 产物测序后在美国国家生物技术信息中心网站进行比对,明确菌种鉴定结果。

**1.4 判断标准** 当 MALDI-TOF 质谱仪、VITEK2 Compact 鉴定仪和显色培养法三者鉴定结果一致时,将此鉴定结果作为最终确认菌种结果;当 MALDI-TOF 质谱仪与 VITEK2 Compact 鉴定仪二者鉴定结果不一致,以 ITS 序列测序结果为确认结果。对 3 种方法获得的鉴定结果进行统计分析。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,计数资料以率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 显色培养法鉴定结果** 206 株酵母菌经显色鉴定,判断正确 128 株,准确率为 67.0%。见表 2。

表 2 206 株酵母菌显色培养法鉴定结果

菌株	株数(n)	准确率[n(%)]
白色假丝酵母菌	124	120(96.8)
光滑假丝酵母菌	20	13(65.0)
热带假丝酵母菌	15	3(20.0)
克柔假丝酵母菌	15	2(13.3)
其他*	32	0(0.0)
合计	206	138(67.0)

注:\*表示显色为白色、不能鉴定的菌株结果

表 3 206 株酵母菌 VITEK2 Compact 鉴定仪鉴定结果

菌株	株数(n)	准确率[n(%)]	菌株	株数(n)	准确率[n(%)]
白色假丝酵母菌	115	113(98.3)	酿酒酵母菌	2	2(100.0)
热带假丝酵母菌	26	25(96.2)	产阮假丝酵母菌	1	0(0.0)
光滑假丝酵母菌	20	19(95.0)	角膜假丝酵母菌	1	0(0.0)
近平滑假丝酵母菌	9	6(66.7)	克勒克酵母菌	1	0(0.0)
克柔假丝酵母菌	3	3(100.0)	挪威假丝酵母菌	1	0(0.0)
葡萄牙假丝酵母菌	3	2(66.7)	乳酒假丝酵母菌	1	0(0.0)
西弗射盾子囊霉菌	3	0(0.0)	其他*	20	0(0.0)

注:\*表示 VITEK2 Compact 鉴定仪不能鉴定的结果

**2.2 VITEK2 Compact 鉴定仪鉴定结果** 206 株酵母菌经 VITEK2 Compact 鉴定仪鉴定,判断正确 170 株,准确率为

82.5%。见表 3。

**2.3 MALDI-TOF 质谱仪鉴定结果** 206 株酵母菌经 MALDI-TOF 质谱仪鉴定,判断正确 191 株,准确率为 92.7%。见表 4。

表 4 206 株酵母菌 MALDI-TOF 质谱仪鉴定结果

菌株	株数(n)	准确率[n(%)]	菌株	株数(n)	准确率[n(%)]
白色假丝酵母菌	121	119(98.3)	Candida metapsilosis	1	1(100.0)
热带假丝酵母菌	28	26(92.9)	季也蒙毕赤酵母菌	1	1(100.0)
光滑假丝酵母菌	26	25(96.2)	Candida orthopsilosis	1	0(0.0)
近平滑假丝酵母菌	8	8(100.0)	东方伊萨酵母菌	1	1(100.0)
克柔假丝酵母菌	4	3(75.0)	发皮安假丝酵母菌	1	0(0.0)
葡萄牙假丝酵母菌	3	2(66.7)	高里假丝酵母菌	1	0(0.0)
酿酒酵母菌	2	2(100.0)	菌膜假丝酵母菌	1	0(0.0)
粗壮假丝酵母菌	1	0(0.0)	马克斯克鲁维酵母菌	1	1(100.0)
阿萨希孢酵母菌	1	1(100.0)	仙人掌有孢汉逊酵母菌	1	1(100.0)
乳酒酵母菌	1	0(0.0)	其他*	2	0(0.0)

注:\*表示 MALDI-TOF 质谱仪不能鉴定的结果,包括 1 株无峰,1 株得分<1.7

**2.4 ITS 测序结果** 对于 VITEK2 Compact 鉴定仪和 MALDI-TOF 质谱仪鉴定结果不一致的菌种,进行 ITS 测序,以测序结果为标准,比较鉴定结果的准确率,见表 5。

表 5 VITEK2 Compact 鉴定仪和 MALDI-TOF 质谱仪鉴定结果的比较[n(%)]

ITS 鉴定菌株	n	VITEK2 Compact 鉴定仪准确率	MALDI-TOF 质谱仪准确率	错误率
白色假丝酵母菌	17	4(23.53)	9(52.94)	4(23.53)
光滑假丝酵母菌	8	2(25.00)	5(62.50)	1(12.50)
近平滑假丝酵母菌	4	1(25.00)	3(75.00)	0(0.00)
热带假丝酵母菌	2	1(50.00)	1(50.00)	0(0.00)
Candida metapsilosis	2	0(0.00)	1(50.00)	1(50.00)
季也蒙毕赤酵母菌	2	0(0.00)	1(50.00)	1(50.00)
库德里阿兹威氏毕赤酵母菌	2	0(0.00)	0(0.00)	2(100.00)
仙人掌有孢汉逊酵母菌	1	0(0.00)	1(100.00)	0(0.00)
Cyberlindnera fabianii	1	0(0.00)	0(0.00)	1(100.00)
马克斯克鲁维酵母菌	1	0(0.00)	1(100.00)	0(0.00)
Meyerozyma caribbica	1	0(0.00)	0(0.00)	1(100.00)
膜醭毕赤酵母菌	1	0(0.00)	0(0.00)	1(100.00)
阿萨孢酵母菌	1	0(0.00)	1(100.00)	0(0.00)
异常威克汉姆酵母菌	1	0(0.00)	0(0.00)	1(100.00)

**2.5 3 种方法鉴定 206 株酵母菌准确率的比较** MALDI-TOF 质谱仪与 VITEK2 Compact 鉴定仪准确率比较,差异有统计学意义( $P=0.006$ ),MALDI-TOF 质谱仪与显色培养法准确率比较,差异有统计学意义( $P=0.001$ )。

**3 讨 论**

酵母菌和类酵母菌引起的严重感染不断增加,尤其是在免疫力低下的患者中尤为突出。每年全世界约有 7 280 万酵母

菌的条件致病患者,其病死率为 33.9%<sup>[3-4]</sup>。近年来不同种类的抗真菌药物被临床应用,因此寻找快速、可靠的鉴定方法成为了治疗真菌感染的关键问题。

目前国内临床微生物实验室鉴定酵母菌的方法较多,显色培养法仅能区分白色假丝酵母菌、热带假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌、克柔假丝酵母菌这 4 种常见的酵母菌,培养时间长,一般 24 h 左右且结果判断易受个人主观因素的影响。基于生化反应原理的 VITEK2 Compact 鉴定仪,所需纯培养菌量较大,数据库中可供比对的菌株仅为 30 多种,鉴定时长,需要 18~24 h,且影响因素较多。随着蛋白质谱技术的发展,MALDI-TOF 质谱仪在临床微生物鉴定领域得到越来越广泛的运用<sup>[5]</sup>,其快速、准确、高通量和成本低廉的优点在感染的诊断中发挥了重要作用。

MALDI-TOF 质谱仪在临床细菌鉴定的应用报道很多<sup>[6-7]</sup>,但用于真菌鉴定的评价较少<sup>[8-9]</sup>,本研究应用 MALDI-TOF 质谱仪对 206 株临床分离酵母菌进行鉴定,与以往常用的显色培养法和 VITEK2 Compact 鉴定仪进行了比较,以评价 MALDI-TOF 质谱仪进行酵母菌鉴定的准确性。3 种方法中,显色培养法鉴定的总准确率为 67.0%,只能鉴定常见的 4 种酵母菌,对白色假丝酵母菌的准确性最好,高达 96.8%,而对白色假丝酵母菌以外的鉴定错误率高(表 2),需要采用其他方法进行补充鉴定。VITEK2 Compact 鉴定仪总准确率为 82.5%,虽能准确鉴定大部分临床分离酵母菌,但对不常见的菌株的鉴定能力有限,本研究 206 株菌中有 20 株没有得到鉴定结果(表 3)。MALDI-TOF 质谱仪的总准确率达 92.7%,不仅能鉴定临床常见酵母菌,对于少见菌的鉴定能力较强(表 4)。通过与 ITS 的测序结果比较,MALDI-TOF 质谱仪准确率高于 VITEK2 Compact 鉴定仪和显色培养法,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

本研究 206 株菌有 2 株没有得到 MALDI-TOF 质谱仪的鉴定结果,13 株与 ITS 测序比对结果不正确,考虑可能原因为数据库中的质谱图有限,且库中质谱图大部分为标准菌株。随着笔者在后续研究中不断完善和补充数据库资源,相信 MALDI-TOF 质谱仪将在临床酵母菌以及其他各种细菌的鉴定中发挥更大的作用。

综上所述,MALDI-TOF 质谱仪与传统的微生物鉴定方法比较,具有快速、简便、准确等优点。本研究结果表明,MAL-

DI-TOF 质谱仪鉴定技术是一种快速、准确,高通量的技术,随着质谱数据的建立和不断完善,MALDI-TOF 质谱仪在各类感染病原体的快速检测方面的应用将会更加广泛。

### 参考文献

- [1] 赖斌,熊梅,杨凌志,等.血液科感染患者致病菌的临床资料分析[J].现代生物医学进展,2013,13(22):4368-4372.
- [2] Schoch CL,Seifert KA,Huhndorf S,et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer(ITS) region as a Universal DNA barcode marker for Fungi[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2012,109(16):6241-6246.
- [3] 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.
- [4] 刘磊,刘彬,李玉,等.呼吸道白色假丝酵母菌感染的临床早期诊断[J].中国老年学杂志,2015,35(3):809-810.
- [5] 宗玉龙,曹源,褚芳波,等.基质辅助激光解吸电力飞行时间质谱在临床微生物检测和鉴定中的应用[J].武警医学,2014,25(20):958-960.
- [6] 鲍春梅,宋新爱,崔恩博,等. MALDI-TOF-MS 鉴定宋内志贺菌的临床应用[J]. 传染病信息,2014,37(3):152-156.
- [7] 刘瑛,俞静,陈峰,等. Microflex™ MALDI-TOF MS 和 Vitek 2 Compact 全自动微生物分析系统对肠杆菌科细菌鉴定能力的比较[J]. 检验医学,2015,30(2):122-127.
- [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假丝酵母菌以外酵母样真菌[J]. 检验医学,2015,30(2):128-131.
- [9] Stevenson LG,Drake SK,Shea YR,et al. Evaluation of Matrix-Assisted laser desorption Ionization-Time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species[J]. J Clin Microbiol,2010,48(10):3482-3486.

(收稿日期:2017-03-15 修回日期:2017-04-22)

(上接第 2522 页)

- [6] Kamalian S,Morais LT,Pomerantz SR,et al. Clot length distribution and predictors in anterior circulation stroke implications for Intra-Arterial therapy[J]. Stroke,2013,44(12):3553-3556.
- [7] Mishra SM,Dykeman J,Sajobi TT,et al. Early reperfusion rates with IV tPA are determined by CTA clot characteristics[J]. Am J Neuroradiol,2014,35(12):2265-2272.
- [8] Kimura K,Iguchi Y,Shibazaki K,et al. IV t-PA therapy in acute stroke patients with atrial fibrillation[J]. J Neurol Sci,2009,276(1/2):6-8.
- [9] Frankel MR,Morgenstern LB,Kwiatkowski T,et al. Pre-

- dicting prognosis after stroke: a placebo group analysis from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Trial [J]. Neurology,2000,55(7):952-959.
- [10] Wahlgren N,Ahmed N,Eriksson N,et al. Multivariable analysis of outcome predictors and adjustment of main outcome results to baseline data profile in randomized controlled trials: Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-MONitoring Study (SITS-MOST) [J]. Stroke,2008,39(12):3316-3322.

(收稿日期:2017-03-19 修回日期:2017-04-26)