

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.10.010

应用 MALDI-TOF-MS 自建鲍氏志贺菌蛋白指纹图谱数据库的研究*

钱扬会,李艳君,丁毅伟,赵强元

(中国人民解放军海军总医院检验科,北京 100048)

摘要:目的 运用 MALDI-TOF-MS 技术建立鲍氏志贺菌的蛋白指纹图谱并将其添加至数据库,实现对临床细菌的快速鉴定,便于临床医生对疾病进行快速而有效的控制。方法 采用甲酸萃取法进行鲍氏志贺菌蛋白指纹图谱的添加,研究不同的标本前处理方法对鉴定结果的影响,并用新分离的鲍氏志贺菌和大肠埃希菌对图谱进行验证。结果 采用新的图谱鲍氏志贺菌提取法鉴定准确率为 95%,直接涂抹法准确率为 79%,对大肠埃希菌的鉴定准确率为 97%。鲍氏志贺菌不同处理方法的鉴定准确率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 新添加的鲍氏志贺菌蛋白指纹图谱能快速准确地鉴定鲍氏志贺菌,此图谱可以应用于鲍氏志贺菌的临床快速诊断。

关键词:鲍氏志贺菌; MALDI-TOF-MS; 数据库; 自建**中图法分类号:**R446.5**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2019)10-1348-03Application of MALDI-TOF-MS to the study of the self-built database of *Shigella boydii**

QIAN Yanghui, LI Yanjun, DING Yiwei, ZHAO Qiangyuan

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

Abstract: Objective To use MALDI-TOF-MS to establish *Shigella boydii* protein fingerprint and add it the database, achieve rapid identification of bacteria for clinicians to control diseases quickly and effectively.

Methods Extraction method was used to create the database of mass spectrum map of *Shigella boydii*, and study the effects of pretreatment methods on identification results, and verified the protein fingerprint by using newly isolated *Shigella boydii* and *Escherichia coli*. **Results** In the new protein fingerprint, the identification rate of *Shigella boydii* was 95%, but identification rate was 79% by acid extraction, the identification rate of *Escherichia coli* was 97%. There was statistical significance in different identification methods of *Shigella boydii* ($P < 0.05$). **Conclusion** The newly added *Shigella boydii* protein fingerprint can rapidly and accurately identify *Shigella boydii*, and this fingerprint can be applied to the rapid clinical diagnosis of *Shigella boydii*.

Key words: *Shigella boydii*; MALDI-TOF-MS; database; self-built

鲍氏志贺菌是典型的革兰阴性菌,主要引起人类细菌性痢疾。近年来因为其耐药性逐年上升,受到了越来越多临床医生的重视。目前对于鲍氏志贺菌的鉴定大多数实验室仍采用 Compact VITEK-2 鉴定加血清凝集实验,然而这些鉴定方法都是基于对细菌生长代谢的产物进行鉴定,耗时往往较长,一般需要 12~72 h,不能满足临床快速诊断和及时医治的需求。因此,实现鲍氏志贺菌的快速鉴定极为重要。16SrRNA 基因测序技术被公认为是细菌鉴定的金标准,但需要对细菌进行纯培养、核酸提取、基因测序等,所用的核酸提取仪及试剂较昂贵,且极易受到污染,不适用于普通实验室^[1]。新型的蛋白质组学检测技术——基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS),因为其快速和低成本的优点而成为临床微生物实验室的尖端设备,其主要原理是待测菌与基质形成结晶体,在激光的照射下,基质分子

获得能量,从而与待测菌吸附,此时带电荷的待测菌就会飞过质谱检测池^[2-3]。由于不同的菌会产生不同质荷比的离子,从而产生不同的飞行指纹图谱,将获得的图谱与图谱库比较,分值最高的就是待测菌鉴定的结果。

1 材料与方法

1.1 标本 建库的鲍氏志贺菌标准菌株来源于国家卫生和健康委员会临检中心临床室间质评中心。用于验证的 100 株鲍氏志贺菌和 100 株大肠埃希菌均是从本院 2017 年 7 月至 2018 年 6 月住院及门诊患者送检标本中分离出来的,经过 Compact VITEK-2 全自动微生物鉴定仪及血清凝集实验鉴定(注:本实验用到的所有菌株均外送至 Lexogen 公司进行 16SrRNA 鉴定)。

1.2 仪器与试剂 采用德国 Bruker 公司生产的 MALDI-TOF-MS 仪、96 孔靶板,法国梅里埃公司生

* 基金项目:海军总医院创新培育基金项目(CXPY201502)。

作者简介:钱扬会,男,技师,主要从事微生物研究。

产的 Compact VITEK-2 微生物分析仪及其配套试剂盒;德国 Sigma 公司生产的批号为 BCBQ0089V 的 50%乙腈-47.5%水-甲酸-三氟乙酸溶液,Bruker DaI-tonik GmbH 公司生产的批号为 0000288399 的质谱样本基质 HCCA 处理液,Bruker DaItonik GmbH 公司生产的细菌实验 BTS 标准品。

1.3 方法

1.3.1 制备样品(甲酸萃取法) EP 管中加入 300 μ L 超纯水,取 5 mg 菌落样品于离心管中,漩涡震荡。加 900 μ L 无水乙醇混匀,13 000 r/min 离心 2 min,重复离心弃上清液,以完全除去乙醇为目的,室温干燥沉淀 2~3 min,加甲酸混匀,再加纯乙腈混匀,13 000 r/min 离心 2 min,吸取 1 μ L 上清液,滴加到靶板的 8 个位置上,室温晾干。再用 1 μ L HCCA 基质溶液覆盖上述样品,室温晾干。

1.3.2 数据库扩增 将点好样品和校准品的靶板放进质谱仪,每个靶位采集 3 张蛋白指纹图谱,每张图谱照射 100 次激光,最终共获得 24 张图谱,在 Flex-Control 软件中打开图谱,去掉不合格的图谱后剩下 20 张,在 Biotyper 中打开这 20 张图谱,建立数据库信息,之后打开“createMSP”,将图谱放在 D:/date/shd 处,完成数据库的建立。

1.3.3 数据采集与分析 数据采集后,使用质谱仪自带数据库和新添加的鲍氏志贺菌数据库进行联合分析鉴定,细菌菌属及种类判断标准见表 1。

表 1 细菌菌属及种类判断标准

鉴定分值(分)	鉴定结果
2.300~3.000	完全可靠地鉴定到种的水平
2.000~2.299	鉴定到种的水平
1.700~1.999	鉴定到属的水平
0.000~1.699	没有可信的鉴定结果

1.3.4 研究标本的不同处理办法对结果的影响 (1)直接涂抹法:取 100 株临床分离的鲍氏志贺菌,挑取单个菌落涂在靶板上,晾干后加基质液,室温放置干燥后进行检验。标准品点在靶位的最后位置。(2)甲酸萃取法:100 株鲍氏志贺菌按照“1.3.1”的方法处理,标准品点在靶板的任一位置。

1.3.5 鲍氏志贺菌蛋白指纹图谱特异性的验证 由于大肠埃希菌和鲍氏志贺菌同为革兰阴性菌,在菌落形态及生物学特性上有些相似,容易误导临床鉴定结果^[4]。所以本次选取了 100 株来自于临床分离的经过 Compact VITEK-2 全自动微生物鉴定仪和质谱仪鉴定的大肠埃希菌,使用质谱仪自带数据库和新添加的鲍氏志贺菌数据库进行分析鉴定(100 株用于验证的大肠埃希菌均送至 Lexogen 公司进行基因鉴定)。

2 结果

2.1 新添加的鲍氏志贺菌蛋白指纹图 建库的鲍氏志贺菌为国家卫生和健康委员会临检中心临床室间质评中心下发的标准菌株,标本的前处理方法为甲酸萃取法,得到的蛋白指纹图,见图 1。

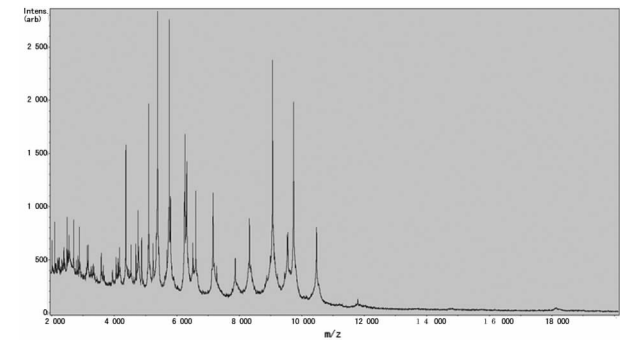


图 1 鲍氏志贺菌蛋白指纹图谱

2.2 鲍氏志贺菌不同处理方法的鉴定结果 利用甲酸萃取法鉴定 100 株鲍氏志贺菌,95 株鉴定分值为 2.300~3.000 分;5 株鉴定为大肠埃希菌,鉴定准确率为 95%。利用直接涂抹法鉴定 100 株鲍氏志贺菌,79 株鉴定分值为 2.300~3.000 分,完全可靠地鉴定到种的水平;5 株鉴定分值为 2.000~2.299 分,鉴定到种的水平;1 株鉴定分值为 1.500 分,没有可信的鉴定结果,15 株鉴定为大肠埃希菌,鉴定准确率为 79%。两种处理方法的鉴定准确率比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 鲍氏志贺菌两种不同处理方法鉴定结果

处理方法	鲍氏志贺菌(n)	大肠埃希菌(n)	分值低(n)	未鉴定出(n)	鉴定准确率(%)
直接涂抹法	79	15	5	1	79
甲酸萃取法	95	5	—	—	95

注:—为无数据

2.3 鲍氏志贺菌蛋白指纹图谱数据库的特异性验证 利用 Biotyper 原有数据库对 100 株大肠埃希菌进行鉴定,100 株大肠埃希菌鉴定分值全部为 2.300~3.000 分,完全准确地鉴定到种的水平,鉴定准确率为 100%。而利用 Biotyper 原有数据库及新建的鲍氏志贺菌数据库联合进行分析鉴定,97 株鉴定分值全部为 2.300~3.000 分,完全准确地鉴定到种的水平,鉴定准确率为 97%。见表 3。经过对大肠埃希菌和鲍氏志贺菌质谱峰图的比对,发现虽然两者在不同相对分子质量的蛋白峰极为相似,但是鲍氏志贺菌有两个特征峰,见图 2。

表 3 鲍氏志贺菌蛋白指纹图谱的特异性

细菌	质谱仪法菌株数(n)	16S rRNA 法菌株数(n)	鉴定准确率(%)
鲍氏志贺菌	95	100	95
大肠埃希菌	97	100	97

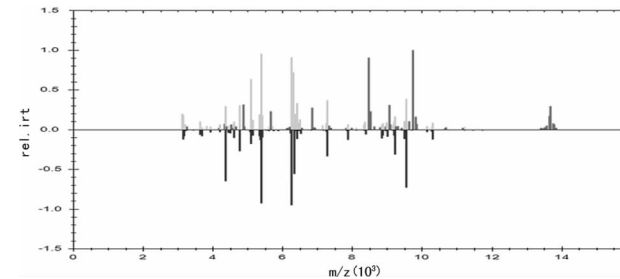


图 2 大肠埃希菌和鲍氏志贺菌质谱峰图

3 讨 论

对于鲍氏志贺菌的鉴定目前大多数实验室仍然采用 Compact VITEK-2 全自动微生物鉴定仪及志贺菌属诊断血清凝集实验,其鉴定周期长,操作繁琐,经常延误临床的诊断,从而导致患者错失最佳治疗时间,不适用于疾病的快速鉴定。而质谱仪法与传统方法相比可以实现快速、准确、低成本的鉴定,明显提高了微生物鉴定的效率^[6]。MALDI-TOF-MS 质谱仪检测前,将样品与基质溶液混合形成结晶,把结晶体放入质谱仪,利用激光轰击结晶体,基质从激光中吸收能量使样品解吸电离,离子化后的分子在时间飞行质谱仪中被加速并被检测,经过飞行时间检测器,将不同质荷比(m/z)的离子分开,以离子的 m/z 为横坐标,离子峰强度为纵坐标,两者构成质谱图,然后与数据库中标准指纹图谱进行比对,最终实现对微生物的鉴定^[6-7]。MALDI-TOF-MS 质谱仪鉴定速度非常快,50 min 就可以轻松处理约 150 份标本,鉴定准确率高,大量文献证实它的鉴定准确率可以达到 95%;分辨率高,可以区分同一细菌的不同株;而且结果稳定,重现性好。目前主库囊括 380 个菌属,2 290 个菌种,5 627 株菌株,100 000 多张图谱,不仅可以应用于医药领域,而且在食品安全、农业与环境、兽医学等方面应用也较普遍。

本文主要研究自建鲍氏志贺菌蛋白指纹图谱,新建的鲍氏志贺菌蛋白指纹图谱鉴定准确率可以达到 95%,能够满足临床鉴定需要,但是这个图谱只能成功鉴定到种的水平,对于鲍氏志贺菌的分型还需要进行相应的血清凝集实验。但相比于鲍氏志贺菌的传统鉴定方法,还是具有快速、准确、低成本的优点。本研究有几点注意事项:(1)对于质谱仪数据库的添加前提是菌种一定要经过分子生物学的鉴定,保证库内没有错菌;(2)影响鉴定的因素也有很多,标本预处理方法不同,鉴定结果相差较大,通过直接涂抹法得到的鉴定准确率只有 79%,而利用甲酸萃取法得到的鉴定准确率可以达到 95%,两种不同鉴定方法差异有统计学意义($P<0.05$)。分析可能的原因是直接涂抹法中样品与基质形成的结晶体均匀性较差,甲酸萃取法中培养基上的杂质能被水和乙醇洗脱掉,分析物质被甲酸保护从而避免被分解,因此得到的质谱离子峰较多,信噪比就会更高。由此可见,标本的前处理方法对于鉴定结果的准确性非常重要,所以规范操作流程,采用统一的标本预处理方法是非常必要的。有学者在对利用质谱仪对沙门菌的鉴定研究中发现,当培养时间延长到 120 h 及以上时不能得到准确的鉴定结果,而培养时间在 72 h 内而且使用不同培养基时仍可以被准确鉴定,由此可见不同培养时间也会影响鉴定结果的准确性^[8]。这一点也提醒临床在实际操作中,要注意标本的培养时间对于鉴定结果准确性的影响。

因为有质谱仪将志贺菌错误的鉴定为大肠埃希菌的报道^[9],所以本实验采用 100 株大肠埃希菌和 100 株鲍氏志贺菌对新建图谱进行特异性的验证,结果使用 Biotyper 原有数据库对 100 株大肠埃希菌进行鉴定,100 株大肠埃希菌全部被鉴定为大肠埃希菌。而使用新添加鲍氏志贺菌数据库进行鉴定,大肠埃希菌的鉴定准确率为 97%,鲍氏志贺菌鉴定准确率为 95%,通过对比可以发现利用新建的数据库对大肠埃希菌的鉴定准确率会下降,由此提示当出现鲍氏志贺菌和大肠埃希菌鉴定结果不确定的情况时,一定要采取血清凝集实验加以辅助鉴定,以免鉴定错误误导临床诊断。

参考文献

- [1] WOO P C,TSOI H W,LEUNG K W,et al. Identification of *Mycobacterium neoaurum* isolated from a neutropenic patient with catheter-related bacteremia by 16S rRNA sequencing[J]. J Clin Microbiol,2000,38(9):3515-3517.
- [2] WERNO A M,CHRISTNER M,ANDERSON T P,et al. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from non-pneumococcal streptococci of the *Streptococcus mitis* group by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol,2012,50(9):2863-2867.
- [3] STEENSELS D,VERHAEQEN J,LAQROU K. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts in a clinical microbiological laboratory:a review[J]. Acta Clin Belg,2011,66(4):267-273.
- [4] RATCLIFFE P,FANG H,THIDHOLM E,et al. Comparison of MALDI-TOF-MS and VITEK II system for laboratory diagnosis of *Granulicatella* and *Abiotrophia* species causing invasive infections[J]. Diagn Microbiol Infect Dis,2013,77(3):216-219.
- [5] 马艳宇,叶丽艳,郭玲. 基质辅助激光解析离子-飞行时间质谱仪在快速鉴定革兰阳性球菌中的应用[J]. 中华医院感染学杂志,2015,25(6):1215-1217.
- [6] 鲍春梅,宋新爱,崔恩博. MALDI-TOF-MS 鉴定宋内志贺菌的临床应用[J]. 传染病信息,2014,27(3):10-13.
- [7] GIEBEL R,WORDEN C,RUST S M,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.
- [8] 梁达炜,梁权辉,方艳平. 基质辅助激光解析飞行时间质谱快速鉴定沙门菌临床分离株[J]. 中国人畜共患病学报,2016,32(7):600-604.
- [9] 韦柳华,罗国兰,李梦薇. VITEK MS 质谱仪错误鉴定福氏志贺菌 1 例[J]. 临床检验杂志,2016,34(4):315-320.