

3 种方法对 1 株临床疑难菌的鉴定及结果比较^{*}

许一丹¹, 谢成彬², 苏 喆², 王频佳^{1△}

1. 成都医学院检验医学院临床微生物学教研室, 四川成都 610500;

2. 四川省妇幼保健院/成都医学院附属妇女儿童医院检验科, 四川成都 610045

摘 要:目的 通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)、16S rRNA 序列分析和全基因组测序(WGS)对从临床标本中分离的 1 株疑似盐单胞菌进行菌种鉴定, 比较 3 种方法的鉴定结果。**方法** 采用 MALDI-TOF MS 对待测菌进行蛋白质图谱收集, 通过比对图谱特征峰实现菌种鉴定; 对菌株进行 16S rRNA 基因测序, 将测序结果与数据库比对; 待测菌 WGS 后进行序列比对分析, 具体包括使用 ANIm 和 ANIb 2 种方法计算平均核苷酸一致性(ANI)以及与基因组分类数据库(GTDB)进行比对; 基于全基因组序列中的 16S rRNA 序列和看家基因序列构建系统进化树, 以及基于 COG 和 KEGG 功能对基因组进行聚类分析。**结果** MALDI-TOF MS 对待测菌株的鉴定结果是 *Halomonas hamiltonii*; 经 16S rRNA 序列分析, 发现待测菌株与 3 种盐单胞菌(*Halomonas hamiltonii*、*Halomonas stevensii* 和 *Halomonas johnsoniae*)的相似度均 > 99%, 且相似度差异非常小, 因此无法进行准确的菌种鉴定; 基于 WGS 的基因序列比对、系统发育树、聚类分析均显示待测菌与 *Halomonas stevensii* 的亲缘关系更为接近。**结论** 3 种方法对分离的 1 株疑难菌的菌种鉴定结果有差异, MALDI-TOF MS 的菌种鉴定操作更加方便、快速, 非常适用于临床检验工作; 基于 WGS 的细菌鉴定更适合用于遗传特征相似的菌种之间的鉴别。

关键词: 细菌鉴定; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 16S rRNA 序列; 全基因组测序

中图法分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2024)09-1224-06

Identification of a clinically difficult bacterial strain by three methods and comparison of results^{*}

XU Yidan¹, XIE Chengbin², SU Zhe², WANG Pinjia^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, School of Medical Laboratory Science, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610500, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Sichuan Provincial Maternity and Child Health Care Hospital, Chengdu, Sichuan 610045, China

Abstract: Objective MALDI-TOF MS, 16S rRNA sequence analysis, and whole genome sequencing (WGS) were applied to identify a strain of suspected *Halomonas* isolated from a clinical specimen and to compare the results of the three methods. **Methods** MALDI-TOF MS was used to collect protein profiles of the bacteria to be tested, and the identification of microorganisms was achieved by comparing the characteristic peaks of the profiles. The 16S rRNA gene sequencing was performed on the bacteria to be tested, and the sequencing results were compared with database. Based on the genomic sequences obtained from WGS, a comparative analysis was performed, including the calculation of Average Nucleotide Identity (ANI) by ANIm and ANIb, and the comparison with the Genome Taxonomy Database (GTDB). Phylogenetic trees were constructed based on 16S rRNA sequences and housekeeping gene sequences from WGS, as well as cluster analysis based on COG and KEGG functions. **Results** MALDI-TOF MS resulted in the identification of the strain to be tested as *Halomonas hamiltonii*. The 16S rRNA gene sequence comparison results showed that the similarity between the bacteria to be tested and the three *Halomonas* species (*Halomonas hamiltonii*, *Halomonas stevensii* and *Halomonas johnsoniae*) were all above 99%, and the difference in their similarity was so small that accurate species identification could not be performed. The gene sequencing comparison based on WGS, phylogenetic tree and cluster analysis showed that the bacterium was more closely related to *Halomonas stevensii*. **Conclusion** The results of the three methods on the strain identification of the isolate are different.

^{*} 基金项目: 四川省大学生创新创业训练计划项目(S202013705085); 成都医学院研究生创新基金项目(YCX2022-03-17); 成都医学院检验医学院自然科学基金(JYZK202206); 四川省妇幼保健院菁英人才科研启动项目(ZC6.16)。

作者简介: 许一丹, 女, 在读研究生, 主要从事细菌致病性的研究。△ 通信作者, E-mail: pinjiawong@foxmail.com。

MALDI-TOF MS is more convenient and fast for species identification, which is very suitable for clinical testing; WGS-based bacterial identification is particularly useful for distinguishing genetically very similar species.

Key words: bacterial identification; MALDI-TOF MS; 16S rRNA sequence; whole-genome sequencing

细菌的准确鉴定是细菌学中最重要、最具挑战性的问题之一,也是抗感染治疗的基础。细菌鉴定的方法有很多种,常用的包括形态学鉴定、生化鉴定和分子生物学鉴定等。由于基于生化鉴定原理的自动微生物鉴定仪早在 1985 年就进入我国临床实验室,并从 20 世纪 90 年代至今广泛用于临床标本的检测,因此细菌生化鉴定是目前临床最常用的细菌鉴定方法^[1-3]。但由于细菌的种类繁多,存在多样性和复杂性,选择的生化鉴定特征可能难以代表全部被鉴定菌株,特别是临床少见菌、罕见菌和未明确分类的细菌,生化鉴定往往难以发挥作用。本课题组前期从临床标本中分离出 1 株细菌,经生化鉴定疑似为盐单胞菌(*Halomonas*),但无法准确鉴定其菌种。针对这株疑难菌,本研究将利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)、16S rRNA 序列分析和基于全基因组测序(WGS)的基因组序列比对 3 种方法进行菌种鉴定,并对鉴定结果进行比较。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 2018 年 7 月从四川省妇幼保健院新生儿重症监护室的 1 例患儿血液标本中分离出 1 株革兰阴性菌,生化鉴定结果显示该菌疑似为盐单胞菌属的细菌,菌株编号为 18071143。

1.2 主要试剂和仪器 哥伦比亚血琼脂平板(郑州博赛生物技术股份有限公司),Autof ms1000 全自动微生物质谱检测系统(郑州安图生物工程股份有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 菌株培养 将受试菌株 18071143 接种于哥伦比亚血琼脂平板,35℃培养 24~48 h,再次转种于哥伦比亚血琼脂平板,35℃培养 18~24 h,挑取纯菌,按照实验要求进行后续的 MALDI-TOF MS 检测、16S rRNA 测序分析以及基因序列比对。

1.3.2 MALDI-TOF MS 检测 按照仪器说明书操作^[4]步骤进行操作。

1.3.3 16S rRNA 序列分析 16S rRNA 基因测序由北京睿博兴科生物技术有限公司完成。将测序所得的 16S rRNA 序列输入 EZBioCloud 细菌 16S 鉴定

数据库(<https://www.ezbiocloud.net/identify>)^[5-6],进行序列相似性分析。物种水平鉴定以 99%核苷酸相似度为标准^[7]。

1.3.4 基于 WGS 的基因组序列比对 WGS 由北京百迈客生物科技有限公司完成。将与菌株 18071143 的 16S rRNA 基因序列相似性>99%的模式菌株作为平均核苷酸一致性(ANI)分析的对比菌株。利用美吉生物云工具(<https://cloud.majorbio.com/page/tools/>)进行 ANI 分析,使用 ANIm 和 ANIb 2 种方法计算 ANI 值。此外,将菌株 18071143 的基因组序列与基因组分类数据库(GTDB)^[8]进行比对,以获得菌种信息。

1.3.5 系统发育分析 基于 WGS 中的 16S rRNA 序列和看家基因(*dnaG*, *frr*, *infC*, *nusA*, *pgk*, *pyrG*, *rplA*, *rplB*, *rplC*, *rplD*, *rplE*, *rplF*, *rplK*, *rplL*, *rplM*, *rplN*, *rplP*, *rplS*, *rplT*, *rpmA*, *rpoB*, *rpsB*, *rpsC*, *rpsE*, *rpsI*, *rpsJ*, *rpsK*, *rpsM*, *rpsS*, *smpB*, *tsf*),选择在 GTDB 中种属水平上与菌株 18071143 最接近的 20 株菌,通过 MEGA7.0 软件采用近邻相接法构建系统进化树。

1.3.6 基因组聚类分析 通过 Spearman 相关性分析,在 COG 和 KEGG 功能上对基因组进行聚类分析,评估菌株 18071143 和与其在 16S rRNA 基因序列相似性>99%的模式菌株之间基因组水平上的亲缘关系。相关系数越接近于 1,表明样本间相关性越好。

2 结 果

2.1 MALDI-TOF MS 检测 MALDI-TOF MS 对菌株 18071143 的鉴定未出现低分辨和无法鉴定的情况,鉴定结果为 *Halomonas hamiltonii*。

2.2 16S rRNA 序列分析 菌株 18071143 的 16S rRNA 基因序列的 GenBank 登录号是 MZ097522.1。该菌株的 16S rRNA 序列经与细菌 16S 鉴定数据库比对应,得到相似度较高的细菌,相似性排名前 5 的细菌见表 1,其中菌株 18071143 与 *Halomonas hamiltonii*、*Halomonas stevensii*、*Halomonas johnsoniae* 的相似度均>99%。

表 1 菌株 18071143 的 16S rRNA 序列比对结果

排名	细菌名称	菌株	GenBank 登录号	相似性(%)
1	<i>Halomonas hamiltonii</i>	W1025	AM941396	99.93
2	<i>Halomonas stevensii</i>	S18214	AJTS01000047	99.86

续表 1 菌株 18071143 的 16S rRNA 序列比对结果				
排名	细菌名称	菌株	GenBank 登录号	相似性(%)
3	Halomonas johnsoniae	T68687	AM941399	99.57
4	Halomonas magadiensis	21M1	X92150	98.85
5	Halomonas aquamarina	DSM 30161	AJ306888	98.35

2.3 基因组序列比对 菌株 18071143 的全基因组序列的 GenBank 登录号是 CP078120.1。通过 ANIm 和 ANIb 2 方法分别计算菌株 18071143 与 Halomonas hamiltonii、Halomonas stevensii 和 Halomonas johnsoniae 3 种盐单胞菌的 ANI 值。2 种算法均显示菌株 18071143 与 Halomonas stevensii 的亲缘关系最近(ANIb= 0.975 1, ANIm= 0.978 6)。将菌株 18071143 与 GTDB 数据库进行比对后发现,与菌株 18071143 最为相似的细菌是 Halomonas

stevensii,见表 2。故基于 WGS 的序列比对分析,菌株 18071143 被鉴定为 Halomonas stevensii。
2.4 系统发育分析 菌株 18071143 基因组中预测到 6 个 16S rRNA 和 31 个看家基因。基于 16S rRNA 和看家基因分别构建系统进化树,见图 1 和图 2。16S rRNA 和看家基因的进化树均显示,菌株 18071143 与 Halomonas stevensii 的亲缘关系最为接近。

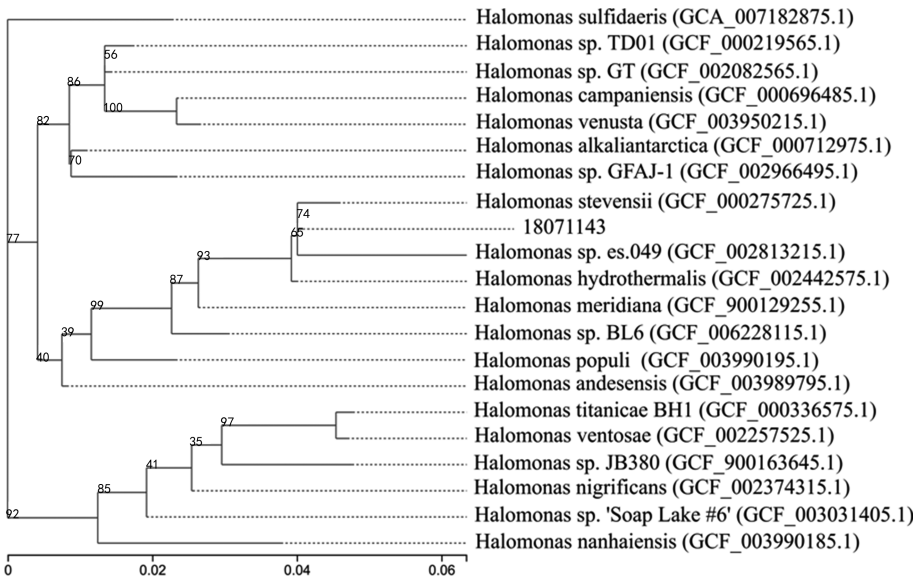


图 1 菌株 18071143 与 20 株盐单胞菌的 16S rRNA 系统的进化树

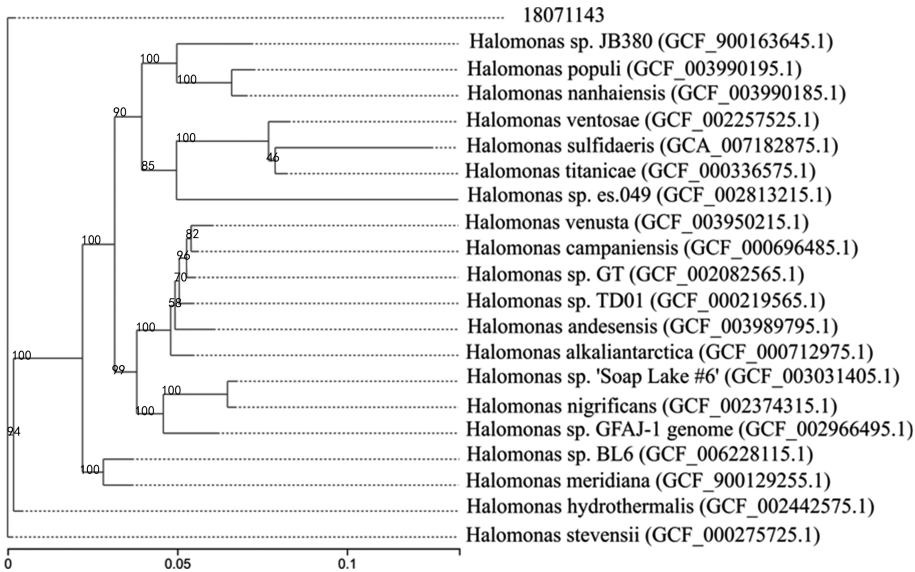
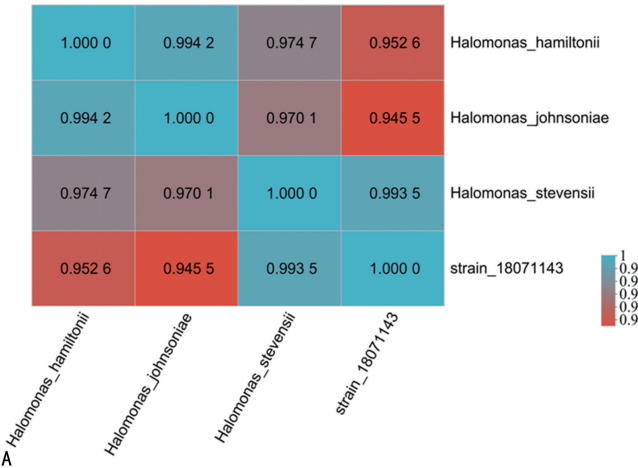
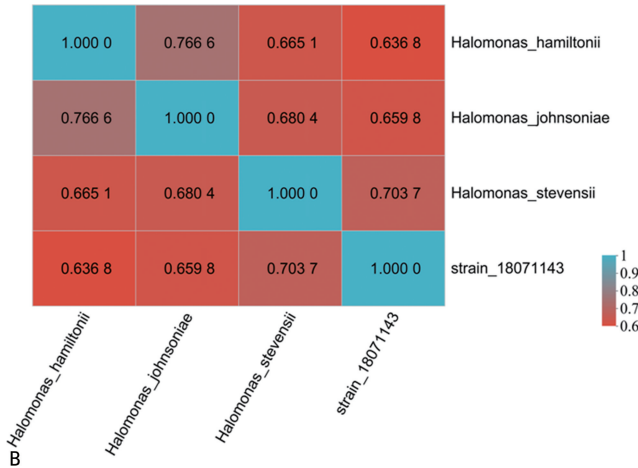


图 2 菌株 18071143 与 20 株盐单胞菌的看家基因系统的进化树

表 2 菌株 18071143 与 GTDB 数据库对比结果		
排名	参考基因组 ID	GTDB 物种分类
1	GCF_000275725.1	Halomonas stevensii
2	GCF_002442575.1	Halomonas hydrothermalis
3	GCF_900129255.1	Halomonas meridiana



2.5 基因组聚类分析 基于的 COG 和 KEGG 功能对基因组进行聚类分析,菌株 18071143 与 Halomonas stevensii 的相关系数分别是 0.993 5 和 0.703 7,相关性最高,因此菌株 18071143 与 Halomonas stevensii 的亲缘关系最为接近。见图 3。



注:A 是基于 COG 功能分类的结果;B 是基于 KEGG 功能注释的结果。

图 3 菌株 18071143 与 Halomonas hamiltonii、Halomonas stevensii、Halomonas johnsoniae 的聚类分析

3 讨 论

作为常规细菌鉴定方法的生化试验虽操作简单,但需要一定的培养时间,且对于一些细菌只能达到区分菌属的程度。MALDI-TOF MS 技术是近年来快速发展的一种用于鉴定多肽、蛋白质的新型软电离质谱技术,由于其具有快速、准确、高通量、易于操作和重复性好等优点,该技术越来越广泛地取代常规方法成为细菌鉴定的一线工具^[9-11]。16S rRNA 基因测序被认为是一种成熟的分类学研究方法^[12],特别适用于 MALDI-TOF MS 数据库中无数据细菌的鉴定^[12-15]。另外,需要进行生物信息学分析,且成本较高的基于 WGS 的菌种鉴定因其方法的高分辨率,使之成为传染病诊断和感染源追踪的一项非常有前景的技术^[16]。在基因组水平上,ANI 分析被认为是菌种鉴定的神器。普遍认为亲缘关系较近的种群间 ANI 值应为 70%~75%,而定义一个种的 ANI 值需要达到 95%~96%^[17-18]。ANI 值一般可以通过 2 种运算方法得出:一种是以 BLASTn 方法为基础(ANIb),另一种以 MUMmer 运算法则为基础(ANIm)。ANI 具有方便、快速、分辨率高的优点,近年来被广泛用于细菌鉴定。ZHOU 等^[19]通过高通量测序技术和 ANI 识别一个名为 AV208 的革兰阳性球菌菌株。JIN 等^[20]利用 ANIb 和全基因组测序的系统发育分析,纠正奈瑟菌属中错误的菌种分类,并指出 GenBank 中的 Neisseria mucosa($n=13$)和 Neisseria sicca($n=16$)应使用 ANIb 和高分辨率系统发育分析重新进行

分类。

本研究结果发现,MALDI-TOF MS、16S rRNA 基因测序和 WGS 对菌株 18071143 在菌属层面的鉴定一致性达到 100%,但在菌种水平的鉴定上却存在差异。MALDI-TOF MS 的鉴定结果为 Halomonas hamiltonii。16S rRNA 基因序列分析最为相似的细菌也是 Halomonas hamiltonii,但菌株 18071143 与 3 种盐单胞菌的序列相似度均>99%,且不同种之间的分辨率低于 0.8%。根据美国临床和实验室标准协会(CLSI)指南^[21]要求,本次 16S rRNA 基因序列分析无法在菌种水平上鉴定细菌。基于 WGS 的 ANI 分析发现,菌株 18071143 更倾向于是 Halomonas stevensii,这一点也从该菌的基因组序列与 GTDB 数据库的比对结果、与相似菌的系统发育以及基因组的聚类分析得到证实。以往有学者指出,16S rRNA 序列分析的主要问题是无法准确确定物种^[22-23]。尽管 16S rRNA 基因序列被广泛用于分类学和系统发育学的研究,但在区分密切相关的菌株和物种时有一定的局限性,尤其是没有基于与公共数据库中序列的相似性来明确识别物种的普遍认可的阈值^[24]。MALDI-TOF MS 也存在同样的问题。MALDI-TOF MS 方法操作简便,非常适用于临床工作,但仪器数据库的完备性也会影响到结果的可靠性^[25]。细菌基因组包含其全部的遗传信息,确定基因组序列成为了解细菌生物学特性与功能特征的基础和前提。细菌全基因组序列信息能够对细菌的鉴定提供最高的分辨率。

本研究利用 3 种方法对临床常规方法无法鉴定到种的盐单胞菌进行了菌种鉴定,结果显示基于 WGS 的鉴定结果更加准确。MALDI-TOF MS 方法简单、快速,适用于临床常规工作;16S rRNA 序列分析分辨率较差,对于某些疑难菌难以准确鉴定;WGS 分辨率高,适用于具有相似遗传学特征的菌种之间的鉴别。因此,在临床工作中若分离到罕见菌株和疑难菌株,建议使用 WGS 技术获取细菌全基因组序列信息,以全面了解该菌的生物学特性与功能特征。

参考文献

- [1] 翁秀清.全自动血培养仪与微生物鉴定仪在临床血液检验中的应用效果以及敏感性、准确性差异研究[J].中国医疗器械信息,2023,29(7):53-55.
- [2] 蒲玉熙,次仁央金,嘎松卓嘎,等.高原地区两种微生物鉴定系统对临床常见病原菌鉴定的一致性分析[J].中国实用医药,2023,18(7):97-99.
- [3] 宋玲玲.微生物鉴定仪在检测妊娠晚期孕妇阴道 B 族链球菌感染率中的应用价值[J].医疗装备,2023,36(11):65-67.
- [4] 沈玲,白欢,李丽,等. AUTOF MS 1000 质谱鉴定系统对临床实验室常见菌株鉴定能力的评估[J].现代检验医学杂志,2020,35(3):100-102.
- [5] SHIN S Y, PARK S, MOON J M, et al. Compositional changes in the gut microbiota of responders and non-responders to probiotic treatment among patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: a post Hoc analysis of a randomized clinical trial[J]. J Neurogastroenterol Motil, 2022, 28(4): 642-654.
- [6] RAI A, UPPADA J, GUPTA D, et al. Neoroseomonas marina sp. nov., isolated from a beach sand[J]. Curr Microbiol, 2022, 79(8): 233.
- [7] KOSECKA-STROJEK M, SABAT A J, AKKERBOOM V, et al. Development and validation of a reference data set for assigning staphylococcus species based on next-generation sequencing of the 16S-23S rRNA region[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 278.
- [8] RINKE C, CHUVCHINA M, MUSSIG A J, et al. A standardized archaeal taxonomy for the Genome Taxonomy Database[J]. Nat Microbiol, 2021, 6(7): 946-959.
- [9] TSUCHIDA S, UMEMURA H, NAKAYAMA T. Current status of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology[J]. Molecules, 2020, 25(20): 4775.
- [10] CHEN X F, HOU X, XIAO M, et al. Matrix-Assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis for the identification of pathogenic microorganisms: a review [J]. Microorganisms, 2021, 9(7): 1536.
- [11] BARTH P O, ROESCH E W, LUTZ L, et al. Rapid bacterial identification by MALDI-TOF MS directly from blood cultures and rapid susceptibility testing: a simple approach to reduce the turnaround time of blood cultures [J]. Braz J Infect Dis, 2023, 27(1): 102721.
- [12] LIANG H, CAI R, LI C, et al. High-throughput sequencing of 16S rRNA gene analysis reveals novel taxonomic diversity among vaginal microbiota in healthy and affected sows with endometritis[J]. Res Vet Sci, 2022, 143: 33-40.
- [13] ALNAKIP M E A, RHOUMA N R, ABD-ELFATAH E N, et al. Discrimination of major and minor streptococci incriminated in bovine mastitis by MALDI-TOF MS fingerprinting and 16S rRNA gene sequencing[J]. Res Vet Sci, 2020, 132: 426-438.
- [14] SULAIMAN I M, MIRANDA N, SIMPSON S. MALDI-TOF mass spectrometry and 16S rRNA gene sequence analysis for the identification of foodborne clostridium Spp [J]. J AOAC Int, 2021, 104(5): 1381-1388.
- [15] CHURCH D L, CERUTTI L, GÜRTLER A, et al. Performance and application of 16S rRNA gene cycle sequencing for routine identification of bacteria in the clinical microbiology laboratory[J]. Clin Microbiol Rev, 2020, 33(4): e00053-19.
- [16] CAMERON A, BOHRHUNTER J L, TAFFNER S, et al. Clinical pathogen genomics[J]. Clin Lab Med, 2020, 40(4): 447-458.
- [17] BARCO R A, GARRITY G M, SCOTT J J, et al. A genus definition for bacteria and archaea based on a standard genome relatedness index[J]. mBio, 2020, 11(1): e02475-19.
- [18] LOUCA S. The rates of global bacterial and archaeal dispersal[J]. ISME J, 2022, 16(1): 159-167.
- [19] ZHOU W Q, GAO S, ZHENG J, et al. Identification of an aerococcus urinaeequi isolate by whole genome sequencing and average nucleotide identity analysis[J]. J Glob Anti-microb Resist, 2022, 29: 353-359.
- [20] JIN Y Q, XU H, YAO Q, et al. Confirmation of the need for reclassification of neisseria mucosa and neisseria sicca using average nucleotide identity blast and phylogenetic analysis of whole-genome sequencing: hinted by clinical misclassification of a neisseria mucosa strain[J]. Front Microbiol, 2021, 12: 780183.
- [21] Clinical and Laboratory Standards Institute. Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by targeted DNA sequencing [S]. 2nd ed. Wayne, PA, USA: CLSI, 2018.
- [22] LAWTON S J, WEIS A M, BYRNE B A, et al. Comparative analysis of campylobacter isolates(下转第 1234 页)

标志物的生物信息学研究[J]. 现代免疫学, 2022, 42(2): 104-111.

[5] BHAN A, SOLEIMANI M, MANDAL S S. Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm[J]. Cancer Res, 2017, 77(15): 3965-3981.

[6] 隋芳, 石林, 杨振, 等. 长链非编码 RNA 在甲状腺癌中的研究进展[J]. 肿瘤, 2022, 42(1): 53-64.

[7] LIU J, WANG Y B, CHU Y J, et al. Identification of a TLR-induced four-lncRNA signature as a novel prognostic biomarker in esophageal carcinoma[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 649.

[8] TAO C M, LUO H T, CHEN L Y, et al. Identification of an epithelial-mesenchymal transition related long non-coding RNA (lncRNA) signature in Glioma[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 4016-4031.

[9] WANG W, LI J, LIN F, et al. Identification of N6-methyladenosine-related lncRNAs for patients with primary glioblastoma[J]. Neurosurg Rev, 2021, 44(1): 463-470.

[10] WU Z K, LIU M M, FU J L, et al. A novel necroptosis-related lncRNA signature for predicting prognosis and immune response of glioma[J]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 3742447.

[11] GONG X Y, NING B B. Five lncRNAs associated with prostate cancer prognosis identified by coexpression network analysis[J]. Technol Cancer Res Treat, 2020, 19: 1533033820963578.

[12] ZHANG Y, JIN T B, SHEN H P, et al. Identification of long non-coding RNA expression profiles and co-expression genes in thyroid carcinoma based on the cancer genome Atlas (TCGA) database[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 9752-9769.

[13] MU Y R, SONG F L, YUAN K, et al. A comprehensive risk assessment and stratification model of papillary thyroid carcinoma based on the autophagy-related lncRNAs[J]. Front Oncol, 2021, 11: 771556.

[14] WANG W L, BAI N, LI X Y. Comprehensive analysis of the prognosis and drug sensitivity of differentiation-related lncRNAs in papillary thyroid cancer[J]. Cancers (Basel), 2022, 14(5): 1353.

[15] QIN Y, ZHANG D, ZHANG H, et al. Construction of a ferroptosis-related five-lncRNA signature for predicting prognosis and immune response in thyroid carcinoma[J]. Cancer Cell Int, 2022, 22(1): 296.

[16] SONG B, TIAN L J, ZHANG F, et al. A novel signature to predict thyroid cancer prognosis and immune landscape using immune-related lncRNA pairs[J]. BMC Med Genomics, 2022, 15(1): 183.

[17] 洪远佳, 岑蔼莹. 甲状腺乳头状癌预后预测因素的研究进展[J]. 海南医学, 2022, 33(24): 3261-3264.

[18] 肖小琴, 冷敏芳, 陆艳萍, 等. 甲状腺乳头状癌组织学亚型及其分子研究进展[J]. 癌症进展, 2021, 19(15): 1517-1519.

[19] JOHAR J, BRITTON H, WISEMAN S M. Older patients with differentiated thyroid cancer exhibit more aggressive pathological characteristics than younger patients[J]. Can J Surg, 2020, 63(1): E69-E70.

[20] SUN Y, DAI W R, LIANG Y Z, et al. Impact of age on the prognosis of papillary thyroid carcinoma[J]. Arch Iran Med, 2020, 23(3): 169-174.

[21] AMIN M B, GREENE F L, EDGE S B, et al. The eighth edition AJCC cancer staging manual; continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(2): 93-99.

[22] TUTTLE R M, HAUGEN B, PERRIER N D. Updated American joint committee on cancer/tumor-node-metastasis staging system for differentiated and anaplastic thyroid cancer (eighth edition): what changed and why[J]. Thyroid, 2017, 27(6): 751-756.

[23] 李兴睿, 徐滔. 美国癌症联合委员会第 8 版分化型甲状腺癌 TNM 分期更新解读[J]. 临床外科杂志, 2019, 27(1): 33-35.

[24] REN R B, PANG B, HAN Y F, et al. A glimpse of the structural biology of the metabolism of sphingosine-1-Phosphate[J]. Contact, 2021, 4: 2515256421995601.

[25] 肖婷, 周菊. 组蛋白修饰作为表观遗传肿瘤标志物的研究进展[J]. 西南医科大学学报, 2019, 42(3): 284-288.

[26] 吴士良. 黏蛋白型 O-聚糖: 结构、功能及与肿瘤的相关性[J]. 生命科学, 2011, 23(6): 563-568.

(收稿日期: 2023-10-19 修回日期: 2023-12-05)

(上接第 1228 页)

from wild birds and chickens using MALDI-TOF MS, biochemical testing, and DNA sequencing[J]. J Vet Diagn Invest, 2018, 30(3): 354-361.

[23] BAKHTIARY F, SAYEVAND H R, REMELY M, et al. Identification of clostridium spp. derived from a sheep and cattle slaughterhouse by matrix-assisted laser desorption and ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and 16S rDNA sequencing[J]. J Food Sci Technol, 2018, 55(8): 3232-3240.

[24] JANDA J M, ABBOTT S L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(9): 2761-2764.

[25] COSTA L V D, MIRANDA R V, REIS C M, et al. MALDI-TOF MS database expansion for identification of Bacillus and related genera isolated from a pharmaceutical facility[J]. J Microbiol Methods, 2022, 203: 106625.

(收稿日期: 2023-10-10 修回日期: 2023-12-01)