

MALDI-TOF MS 鉴定酵母菌应用评价

张博筠, 叶乃芳, 王中新

摘要 目的 评估 MALDI-TOF MS 鉴定酵母菌的能力。方法 分别用 VITEK MS 和 API ID 32C 系统同时鉴定 387 株临床分离酵母菌。以 ITS 测序结果作为比较标准。比较 MALDI-TOF MS、API ID 32C 结果准确率。结果 VITEK MS 鉴定酵母菌准确率为 97.7%, API ID 32C 鉴定准确率为 93.0%, 差异有统计学意义($\chi^2 = 9.439, P = 0.002$); MALDI-TOF 与 ITS 测序相比, 差异无统计学意义。结论 MALDI-TOF 可对临床常见酵母菌快速、准确鉴定到种。

关键词 酵母样真菌; ITS 基因测序; MALDI-TOF MS

中图分类号 R 446.53

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)04-0501-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.008

近年来临床实验室陆续显示新病原体, 如 *Candida nivariensis*^[1-2]、*Candida bracarensis*^[3] 和格特隐球菌等^[4]。传统方法如科玛嘉显色培养法、API ID 32C 生化鉴定系统和全自动微生物鉴定仪 VITEK compact yeast 难以区分遗传学相近的物种。大多数真菌核糖体内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS) PCR 扩增后进行测序可以鉴定到种水平, 准确率接近 100%, 常作为真菌鉴定金标准^[5]。基质辅助激光解析/电离-飞行时间质谱分析(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 是近年来鉴定微生物的新方法。该方法通过对比分析待测菌株与菌株库中的蛋白图谱, 鉴定出病原菌。VITEK MS IVD(V2.0) 质谱仪是利用 MALDI-TOF 方法的仪器之一。该实验用 API ID 32C 生化鉴定系统和 VITEK MS IVD(V2.0) 质谱仪分别鉴定临床致病菌株, 以 ITS 测序结果作为比较标准, 比较两种方法的准确率。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 收集 2011 年~2015 年安徽医科大学第一附属医院检验科和安徽省立医院检验科分离的酵母菌, 共 25 种 387 株(菌株来源脑脊液、胸水、痰、尿、血、脓液、导管、粪便)。使用大肠杆菌 ATCC 8739 作为仪器校准菌株, 光滑假丝酵母菌 ATCC MYA-2950 作为质控菌株。

1.2 主要仪器与试剂 酵母基因组 DNA 提取试剂盒(北京爱得莱生物公司); DL 2 000 DNA Marker 和 Premix Ex Taq 酶体系(日本 TaKaRa 公司); 真菌 ITS 基因通用引物 ITS1 和 ITS4(上海生工生物公司); API ID 32C 酵母鉴定系统、VITEK MS-FA、VITEK MS-CHCA 基质、靶板和 VITEK MS IVD(V2.0) 质谱仪(法国 Biomérieux 公司); PCR 仪(德国 Biometra 公司); 电泳仪(北京六一仪器厂); 全自动凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 方法 将菌株从 -80 °C 菌株库取出, 接种于沙堡弱培养基, 35 °C 培养 24~72 h 后, 选择单个菌落, 分别按照说明书用 VITEK MS 和 API ID 32C 进行鉴定, 记录结果。按照说明书提取待测菌株基因组 DNA, 用真菌通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3')、ITS4(5'-CCTCCGCTTATT-GATATG-3') PCR 扩增真菌核糖体基因内转录间隔区。反应体系共 50 μ l: 25 μ l TaKaRa Premix Ex Taq 2 μ l ITS1 引物(10 mol/L) 2 μ l ITS4 引物(10 mol/L) 模板 1 μ l, 灭菌双蒸水 30 μ l。条件: 94 °C 预变性 8 min; 95 °C 变性 30 s; 55 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 1 min; 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后送上海生工生物公司测序, 结果经 Blast(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 检索后与 GenBank 进行同源比对, 同源性 >97% 判定为同属, 同源性 \geq 99% 判定为同种。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 16.0 对各鉴定结果进行统计分析, 对鉴定准确率进行比较采用 χ^2 检验, 计算 χ^2 值 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2017-02-05 接收

基金项目: 安徽省高校省级自然科学基金项目(编号: KJ2015A337)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230022

作者简介: 张博筠, 女, 硕士研究生;

王中新, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: aywzhx87

@126.com

2 结果

2.1 ITS 测序、MALDI-TOF 和 API ID 32C 法鉴定结果及比较 以 ITS 测序结果作为标准,用 MALDI-TOF 和 API ID 32C 法鉴定 387 株酵母菌。MALDI-TOF 准确鉴定 378 株,准确率为 97.7%; API ID 32C 准确鉴定 360 株,准确率为 93.0%(表 1),两者之间差异有统计学意义($\chi^2 = 9.439, P = 0.002$)。MALDI-TOF 错误或未鉴定出 9 株; API ID 32C 错误或未鉴定出 27 株(表 2)。MALDI-TOF 与 ITS 测序相比,鉴定所有 387 株酵母菌,差异无统计学意义。

表 1 175 株酵母菌 ITS 测序、MALDI-TOF 和 API ID 32C 系统鉴定结果株数(n)

ITS	MALDI-TOF			API ID 32C		
	正确	错误	未鉴定出	正确	错误	未鉴定出
白假丝酵母菌(60)	60	0	0	60	0	0
热带假丝酵母菌(60)	60	0	0	60	0	0
光滑假丝酵母菌(57)	57	0	0	56	1	0
克柔假丝酵母菌(76)	76	0	0	76	0	0
近平滑假丝酵母菌(47)	47	0	0	47	0	0
高里假丝酵母菌(12)	12	0	0	10	0	2
新生隐球菌(19)	19	0	0	15	0	4
罗伦特隐球菌(1)	1	0	0	0	0	1
格特隐球菌(3)	0	0	3	0	2	1
浅白隐球菌(2)	2	0	0	0	0	2
葡萄牙假丝酵母菌(7)	7	0	0	7	0	0
木兰假丝酵母菌(1)	1	0	0	0	0	1
皱褶假丝酵母菌(6)	6	0	0	6	0	0
无名假丝酵母菌(3)	3	0	0	0	0	3
菌膜假丝酵母菌(3)	1	2	0	1	2	0
乳酒假丝酵母菌(2)	2	0	0	0	0	2
希木龙假丝酵母菌(1)	1	0	0	0	0	1
产朊假丝酵母菌(4)	4	0	0	1	0	3
链状假丝酵母菌(1)	0	0	1	1	0	0
平常假丝酵母菌(3)	2	1	0	3	0	0
中间假丝酵母菌(3)	2	1	0	3	0	0
埃切德巴利酵母(8)	8	0	0	8	0	0
阿沙孢酵母(6)	6	0	0	6	0	0
弗比恩毕赤酵母(1)	0	0	1	0	1	0
小红酵母(1)	1	0	0	0	1	0
合计	378	4	5	360	7	20

2.2 常见菌种及少见菌种 MALDI-TOF 和 API ID 32C 法比较 两种方法鉴定常见菌种(白假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌、热带假丝酵母菌、克柔假丝酵母菌和近平滑假丝酵母菌)准确率分别为: 100% 和 99.7%, 两者之间差异无统计学意义; 两种方法对本试验其它酵母菌鉴定准确率分别为: 89.7%、70.1%, 差异有统计学意义($\chi^2 = 9.156, P = 0.002$)。

表 2 MALDI-TOF 和 API ID 32C 与测序结果不同菌株数(n)

ITS	MALDI-TOF	API ID 32C
光滑假丝酵母菌(57)	光滑假丝酵母菌(57)	光滑假丝酵母菌(56) 接合酵母属(1)
新生隐球菌(19)	新生隐球菌(19)	新生隐球菌(15) 未鉴定出(4)
罗伦特隐球菌(1)	罗伦特隐球菌(1)	未鉴定出(1)
格特隐球菌(3)	未鉴定出(3)	新生隐球菌(2) 未鉴定出(1)
浅白隐球菌(2)	浅白隐球菌(2)	未鉴定出(2)
菌膜假丝酵母菌(3)	菌膜假丝酵母菌(1) 埃切德巴利酵母(2)	菌膜假丝酵母菌(1) 埃切德巴利酵母(2)
高里假丝酵母菌(12)	高里假丝酵母菌(12)	高里假丝酵母菌(10) 未鉴定出(2)
木兰假丝酵母菌(1)	木兰假丝酵母菌(1)	未鉴定出(1)
链状假丝酵母菌(1)	近平滑假丝酵母(1)	链状假丝酵母菌(1)
无名假丝酵母菌(3)	无名假丝酵母菌(3)	未鉴定出(3)
乳酒假丝酵母菌(2)	乳酒假丝酵母菌(2)	未鉴定出(2)
希木龙假丝酵母菌(1)	希木龙假丝酵母菌(1)	未鉴定出(1)
小红酵母(1)	小红酵母(1)	粘红酵母(1)
平常假丝酵母菌(3)	平常假丝酵母菌(2) 挪威假丝酵母(1)	平常假丝酵母菌(3)
产朊假丝酵母菌(4)	产朊假丝酵母菌(4)	产朊假丝酵母菌(1) 未鉴定出(3)
中间假丝酵母菌(3)	中间假丝酵母菌(2) 清酒假丝酵母(1)	中间假丝酵母菌(3)
弗比恩毕赤酵母(1)	未鉴定出(1)	粉状毕赤酵母(1)

3 讨论

酵母菌可引起脑膜炎、肺炎及血流等多处感染。近年来由酵母菌引起的感染率逐年增高,约占 88.5%。鉴于传统方法如 API ID 32C 鉴定时间长, MALDI-TOF 作为一种鉴定病原微生物的新方法,具有快速、重复性好的特点。目前国内关于两种方法的比较不多,不常见假丝酵母菌报道甚少。因此,本研究通过鉴定 387 株临床分离的酵母菌,验证新方法可靠性,同时对少见菌株进行补充。

MALDI-TOF 鉴定常见酵母菌(白假丝酵母、光滑假丝酵母、热带假丝酵母、克柔假丝酵母和近平滑假丝酵母)准确率高,这与既往研究^[6-7]结果相似。本实验中两种方法鉴定上述常见菌株准确率无明显差别。既往研究^[8-9]显示 API ID 32C 鉴定临床少见酵母菌检出率不高、置信度较低。MALDI-TOF 在本研究中鉴定少见酵母菌总的准确率高于 API ID 32C 法。需要注意的是,链状假丝酵母菌、平常假丝酵母菌和中间假丝酵母菌 API ID 32C 鉴定准确率高于 MALDI-TOF。Keceli et al^[10]报道链状假丝酵母菌 MALDI-TOF 错误鉴定为近平滑念珠菌,鉴定该菌株准确率低于 API ID 32C,与本实验结果一致。

但这可能与样本量少有关,需进一步验证其结论准确性。

API ID 32C 和 MALDI-TOF 同时将 2 株菌膜假丝酵母菌鉴定为埃切德巴利酵母。前者感染可造成新生儿呼吸暂停或周期样呼吸^[11]。目前尚无埃切德巴利酵母感染中文报道,若实验室鉴定出该菌,推荐 ITS 测序复查。本实验中两种方法均无法鉴定格特隐球菌,原因可能是格特隐球菌是新生隐球菌变种^[12],与其生化反应相似,造成 API ID 32C 错误鉴定。本研究使用的 MALDI-TOF 数据库中无该菌株,仪器分析得到的菌株数据无法与真实菌株匹配。但国外报道^[13] MALDI-TOF 可区分新生隐球菌与格特隐球菌,这可能因为数据库不同。Levesque et al 报道^[14] 另一种 MALDI-TOF 仪器 Bruker Biotyper 比 VITEK MS 鉴定不常见酵母菌准确率高。同样因为本实验室 MALDI-TOF 数据库没有弗比恩毕赤酵母,所以该菌不能鉴定。可见质谱法准确性依赖数据库中菌株种类,因此,实验室需不断更新和补充数据库。

API ID 32C 鉴定板需分离纯化后鉴定,时间较长。MALDI-TOF 鉴定酵母菌只需 1~2 个单个菌落,可省去菌株分离纯化时间,检测单个样本只需 5~10 min,可以显著提高工作效率。同时 MALDI-TOF 鉴定每株菌耗材少,成本低,明显少于 API ID 32C 板条消耗^[15]。

通过本研究显示, MALDI-TOF 对酵母菌鉴定准确率与 ITS 测序相同,高于 API ID 32C 生化鉴定系统,成本低,耗时少。因此,该方法可以快速诊断真菌,便于合理选择抗生素,但需不断完善数据库菌株,进一步提高准确率。综上所述, MALDI-TOF 是一种比较快速、准确鉴定致病性酵母菌的方法,值得在临床实验室推广。

参考文献

[1] Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Isla G, et al. Prevalence of *Candida bracarensis* and *Candida nivariensis* in a Spanish collection of yeasts: comparison of results from a reference centre and from a population-based surveillance study of candidemia[J]. Med Mycol 2011, 49(5): 525-9.

[2] Figueiredo-Carvalho M H, Ramos Lde S, Barbedo L S, et al. First description of *Candida nivariensis* in Brazil: antifungal susceptibility profile and potential virulence attributes[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz 2016, 111(1): 51-8.

[3] Quiles-Melero I, García-Rodríguez J, Gómez-López A, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-

flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for identification of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012, 31(1): 67-71.

[4] Aznar-Marin P, Galan-Sanchez F, Marin-Casanova P, et al. *Candida nivariensis* as a new emergent agent of vulvovaginal candidiasis: description of cases and review of published studies [J]. Mycopathologia 2016, 181(5-6): 445-9.

[5] Kathuria S, Singh P K, Sharma C, et al. Multidrug-resistant *Candida auris* misidentified as *Candida haemulonii*: characterization by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and DNA sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by vitek 2, CLSI broth microdilution, and estest method [J]. J Clin Microbiol 2015, 53(6): 1823-30.

[6] Dhieb C, Normand A C, Lollivier C, et al. Comparison of MALDI-TOF mass spectra with microsatellite length polymorphisms in *Candida albicans* [J]. J Mass Spectrom 2015, 50(2): 371-7.

[7] Fatania N, Fraser M, Savage M, et al. Comparative evaluation of matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry and conventional phenotypic-based methods for identification of clinically important yeasts in a UK-based medical microbiology laboratory [J]. J Clin Pathol 2015, 68(12): 1040-2.

[8] Latouche G N, Daniel H M, Lee O C, et al. Comparison of use of phenotypic and genotypic characteristics for identification of species of the anamorph genus *Candida* and related teleomorph yeast species [J]. J Clin Microbiol 1997, 35(12): 3171-80.

[9] Gayibova Ü, Dalyan Cİlo B, Ağca H, et al. Comparison of Phoenix Yeast ID Panel and API(R) ID 32 C commercial systems for the identification of *Candida* species isolated from clinical samples [J]. Mikrobiyol Bul, 2014, 48(3): 438-48.

[10] Keçeli S A, Dündar D, Tamer G S. Comparison of vitek matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry versus conventional methods in *Candida* identification [J]. Mycopathologia 2016, 181(1-2): 67-73.

[11] 卢岩,张秀月,施宏. 新生儿菌膜假丝酵母菌感染分析及干预评价 [J]. 中华医院感染学杂志 2013, 23(20): 4964-6.

[12] 冯晓博,姚志荣. 格特隐球菌病暴发流行机制的研究进展 [J]. 微生物与感染 2010, 5(1): 47-50.

[13] 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.

[14] Lévesque S, Dufresne P J, Soualhine H, et al. A side by side comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: utility of MALDI-TOF MS technology for microorganism identification in a public health reference laboratory [J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0144878.

[15] Dhiman N, Hall L, Wohlfiel S L, et al. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast [J]. J Clin Microbiol 2011, 49(4): 1614-6.

网络出版时间: 2017-3-21 13:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170321.1344.009.html>

海藻酸钠壳聚糖支架合成骨细胞 特异性多肽修复兔颅骨缺损

陈慧敏 宋婷婷 吴齐越 高启坤 庄艳琴 吴明月

摘要 目的 评价成骨细胞特异性识别多肽在骨缺损中的修复效果。方法 将成骨细胞特异性识别多肽与海藻酸钠/壳聚糖水凝胶(SA/CS Gel)复合植入兔颅骨双侧 ϕ 15 mm圆形极限骨缺损区,实验组缺损处植入海藻酸钠/壳聚糖/成骨细胞特异性识别多肽水凝胶(SA/CS/多肽 Gel),对照组植入SA/CS Gel,空白组不植入任何载体及药物,随机分组。术后8周活体行CBCT扫描,随后处死取材并常规HE染色行组织学检查观察成骨效果。结果 影像学及组织形态学结果可见,实验组缺损区成骨量明显大于对照组及空白组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 成骨细胞特异性识别多肽可促进兔颅骨缺损的骨修复。

关键词 成骨细胞特异性识别多肽; 颅骨缺损; 海藻酸钠/壳聚糖复合凝胶

中图分类号 R 318.08

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)04-0504-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.009

外伤、肿瘤、炎症及先天疾病等造成的颅颌面骨缺损一直是临床治疗的难题,目前的骨缺损修复方法均存在一定不足,组织工程骨因材料来源丰富,加工生产方法简单等优点为骨缺损修复研究提供了新的思路和方法。该实验依据组织工程学原理,以课题组前期研究获得的成骨细胞特异性识别多肽作为信号因子,海藻酸钠/壳聚糖水凝胶(sodium alginate and chitosan composite hydrogels, SA/CS Gel)作为支架材料,将两者复合植入兔颅骨极限骨缺损的动物模型内,以评价该特异性多肽的促成骨效应。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组 健康新西兰兔12只(安徽医科大学动物实验中心提供),雌雄不限,2.8~3.5 kg,实验室内适应性饲养1周。12只新西兰兔均双侧制备 ϕ 15 mm的骨缺损,实验组缺损处植入SA/CS/多肽 Gel,对照组植入SA/CS Gel,空白组不植入

2017-02-05 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81170993)

作者单位: 安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究中心实验室,合肥 230032

作者简介: 陈慧敏,女,硕士研究生;

吴明月,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: wumingyue321@126.com

Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry for identification of clinical yeasts

Zhang Boyun, Ye Naifang, Wang Zhongxin

(Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To evaluate the ability of MALDI-TOF MS in identification of the yeast isolated from clinical specimens. **Methods** 387 strains of yeasts were tested. All the strains were from clinical specimen and identified by VITEK MS and API ID 32C system at the same time. Sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) regions of ribosomal DNA was used as the reference method in the analysis of a total of 387 yeast isolates. The accuracy of detected results was analyzed by the χ^2 test. **Results** The identification accuracy rates of VITEK MS, API ID 32C were respectively 97.7% and 93.0%. The difference was statistically significant ($\chi^2 = 9.439, P = 0.002$). There was no statistical significance between MALDI-TOF and ITS sequencing. **Conclusion** MALDI-TOF is a rapid simple and accurate method which is identified to species level in identification of yeasts.

Key words yeast; ITS gene sequencing; MALDI-TOF MS