

• 论 著 •

巴尔通体 MALDI-TOF MS 数据库的建立与鉴定方法的评价*

栗冬梅,徐爱玲,杜小莉,宋秀平,崔志刚,刘起勇[△]中国疾病预防控制中心传染病预防控制所/传染病预防控制国家重点实验室/
感染性疾病诊治协同创新中心,北京 102206

摘要:目的 建立巴尔通体的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)数据库和质谱鉴定方法,利用野生菌株进行验证、评价。方法 应用 MALDI-TOF MS 采集巴尔通体 ATCC 标准菌株和国内流行菌株的质谱数据,每株菌采集 24 张的质谱图集,获得特定的蛋白指纹图谱,汇总成不同种巴尔通体的标准质谱图,建立巴尔通体 MALDI-TOF MS 标准数据库。比较乙醇-甲酸提取法和直接涂抹法对质谱鉴定结果的影响,并进行重复性实验评估方法的稳定性。进一步应用 173 株野生巴尔通体菌株评估该标准数据库和相应的质谱鉴定方法。结果 应用汉赛巴尔通体、五日热巴尔通体和杆菌样巴尔通体等 21 种/亚种巴尔通体,共计 200 株多地区来源的地理菌株,建立了巴尔通体 MALDI-TOF MS 蛋白指纹图谱标准数据库。2 种样品制备方法均可以达到正确鉴定标准,提取法质谱得分略高于直接涂抹法。应用 8 种、16 株巴尔通体菌株进行的重复性验证,得分为(9.078±0.031)~(9.776±0.006)分,变异系数(CV)为 0.06%~1.12%。14 种、173 株巴尔通体测试菌株的质谱鉴定得分为 9.014~9.796 分,平均(9.462±0.195)分,在种水平上能被正确识别。结论 基于该研究自主建立的巴尔通体质谱数据库,MALDI-TOF MS 技术能够快速、准确鉴定巴尔通体种类,该课题组所建立的巴尔通体质谱标准数据库具有重要应用价值,对临床上巴尔通体病的实验室检验与诊断具有重要意义。

关键词:巴尔通体; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 苛养菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.04.001

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2021)04-0385-08

文献标志码:A

Identification of *Bartonella* species by MALDI-TOF mass spectrometry*LI Dongmei, XU Ailing, DU Xiaoli, SONG Xiuping, CUI Zhigang, LIU Qiyong[△]State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control/Collaborative
Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases/National Institute for
Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for
Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Abstract: Objective To establish a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) database and mass spectrometry identification method for *Bartonella* species which were verified and evaluated by using the wild strains of *Bartonella* spp. **Methods** We explored MALDI-TOF MS method to collect the data of the ATCC standard and domestic epidemic strains of *Bartonella* spp., which comprising specific protein fingerprints for each strain from 24 consensus spectrum obtained for each species. The database of MALDI-TOF MS for *Bartonella* spp. was created using the standard mass spectra of different *Bartonella* species. We compared the ethanol-formic acid extraction and the direct transfer methods for sample preparation and performed repeatability experiments to evaluate the stability of the method. Furthermore, 173 wild *Bartonella* strains were used to evaluate the MS database and the corresponding mass spectrometric method for *Bartonella* identification. **Results** A standard protein fingerprints database of MALDI-TOF MS for *Bartonella* was established by using a total of 200 strains from multiple geographical origins, representing 21 recognized species/subspecies of *Bartonella*, including *B. henselae*, *B. quintana*, *B. bacilliformis* and the others. Both of the two methods of sample preparation were able to be employed to correctly identify the strains, and the MS scores from the ethanol-formic acid extraction method were slightly higher

* 基金项目:国家科技重大专项(2018ZX10712001,2017ZX10303404)。

作者简介:栗冬梅,女,研究员,主要从事病原生物学的相关研究。△ 通信作者,E-mail:liuqiyong@icdc.cn。

本文引用格式:栗冬梅,徐爱玲,杜小莉,等.巴尔通体 MALDI-TOF MS 数据库的建立与鉴定方法的评价[J].国际检验医学杂志,2021,42(4):385-392.

than those from the direct transfer method. The average scores of MS ranged from (9.078 ± 0.031) to (9.776 ± 0.006) and the CV values were between 0.06% and 1.12% from the data of reproducibility in intra- and inter-run experiments using 16 strains representing 8 species of *Bartonella*. One hundred and seventy-three tested *Bartonella* strains, representing 14 *Bartonella* species were accurately identified at the species level with identification scores ranging from 9.014 to 9.976 (9.462 ± 0.195) . **Conclusion** MALDI-TOF MS technology can be used to identify *Bartonella* strains at the species level quickly and accurately based on an independently established database of mass spectra for *Bartonella* spp. in this study. Our standard database of *Bartonella* mass spectrometry plays an important role in testing and diagnosis of *Bartonella* disease in clinical microbiology laboratory.

Key words: *Bartonella*; MALDI-TOF MS; fastidious bacteria

巴尔通体是一群寄生于哺乳动物体内的营养要求苛刻、革兰染色阴性需氧杆菌,其宿主范围广泛、全球分布,部分种类对人和动物具有致病性,分类学上属于 α -变形菌纲、根瘤菌目、巴尔通体科。目前有 37 种(包括亚种)巴尔通体被正式命名,与其近源的致病菌有引起人布鲁氏菌病的布鲁氏菌和植物致病菌根瘤土壤杆菌。巴尔通体侵袭哺乳动物,在其体内复制繁殖,可持续感染红细胞形成菌血症,通过动物间打斗、抓咬行为或者吸血节肢动物在宿主与宿主、宿主与人之间传播^[1],引起猫抓病、战壕热、心内膜炎和卡瑞恩病等多系统疾病,临床表现复杂多样。巴尔通体是苛养菌,生长缓慢,生化反应不活泼、没有特征性的菌落形态和染色鉴定方法,只能依靠 DNA 序列进行分类鉴定,增加了实验室操作难度,使得诊断更为困难^[2-3]。

质谱技术是 20 世纪发展起来的生物大分子分析技术,主要用于蛋白质、肽分子鉴定。近年,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术(MALDI-TOF MS)已广泛应用于革兰阴性/阳性菌、需氧/厌氧菌以及分枝杆菌、酵母菌和真菌的鉴定,成为微生物鉴定最成功的生物技术之一^[4-5]。不同种属微生物各自具有特定的蛋白质组成,经 MALDI-TOF MS 检测可以获得不同强度的质荷比(m/z),形成肽/蛋白指纹质谱图,与标准库中的图谱进行比对可以实现细菌的种属鉴定。该技术操作简单方便,鉴定准确快速,高通量和低成本也是其主要优势,除了可鉴定常见细菌和真菌,还极大地提高了临床微生物实验室对苛养菌及分枝杆菌等难鉴定的病原微生物的识别效率和能力^[6],目前已快速成为临床微生物实验室常规配备的检测技术^[7-8]。

MALDI-TOF MS 技术用于巴尔通体鉴定,无疑是其鉴定方法的重要补充和发展。到目前为止,国际上仅 FOURNIER 等^[9]报道了应用 17 种、17 株巴尔通体参考菌株和 39 株盲测菌株进行了有关巴尔通体质谱鉴定方法的研究。国内尚无对于巴尔通体质谱鉴定方法的研究,且进口和国产的微生物 MALDI-TOF MS 仪的数据库中均无巴尔通体的参考质谱图,

在疾病预防控制系统和临床实验室均无法应用该技术进行巴尔通体鉴定,限制了该技术在巴尔通体相关疾病诊断和控制中的应用和发展。在本研究中,课题组应用 21 种、200 株巴尔通体菌株,涵盖了全部重要致病种,建成巴尔通体质谱鉴定基础数据库,并应用 173 株多宿主多地区来源的野生菌株对样品处理方法和该数据库进行测试,证实 MALDI-TOF MS 用于巴尔通体菌株鉴定准确、快速,适用于今后临床微生物实验室相关病原菌的检测鉴定。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 选取 21 种/亚种巴尔通体,包括汉赛巴尔通体、杆菌样巴尔通体、五日热巴尔通体、伊丽莎白巴尔通体、文森巴尔通体伯格霍夫亚种、格拉汉姆巴尔通体、科勒巴尔通体、克氏巴尔通体、道志巴尔通体、文森巴尔通体文森亚种、文森巴尔通体阿鲁潘亚种、特利波契巴尔通体、日本巴尔通体、黑瞎子巴尔通体、昆州巴尔通体、森林巴尔通体、库珀巴尔通体、非洲跳鼠巴尔通体、丽松鼠巴尔通体、泰勒巴尔通体和地松鼠巴尔通体,200 株巴尔通体菌株用于建立 MALDI-TOF MS 标准数据库(表 1)。应用 173 株巴尔通体野生分离菌株用于验证评价所建质谱数据库和鉴定方法的可信度(表 1)。这些菌株包含 12 株巴尔通体 ATCC 标准菌,其他为北京、山东、河南、青海、西藏和新疆等地的野生菌株,分别分离自猫、犬、猕猴和多种啮齿动物。其他菌株包括牛种布鲁氏菌人用疫苗株 104M、犬种布鲁氏菌 RM6/66、根瘤土壤杆菌 ATCC33970、金黄色葡萄球菌 ATCC29213 和大肠埃希菌 ATCC25922。本研究全部菌株由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所提供。

1.2 仪器与试剂 Autof ms1000 全自动微生物质谱检测系统(郑州安图实验仪器有限公司)、371 型 CO₂ 培养箱(Thermo 公司)、NU-425-600E 生物安全柜(Nuaire 公司)、LabCycler PCR 仪(SensoQuest 公司)、台式离心机(Sigma 公司 1-14 型)、胰酶大豆琼脂(BD 公司)、三氟乙酸(质谱级,Fluka 公司)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA,质谱级,Sigma 公司),质谱样本预处理试剂盒(包括裂解液 1、裂解液 2、缓冲液和基

质)、微生物质谱鉴定仪用校准品和样品靶板(郑州安图实验仪器有限公司),其中裂解液 1、裂解液 2 和缓冲液分别为含甲酸、乙腈和三氟乙酸的溶液;基质溶

液为 α -氨基-4 羟基肉桂酸(CHCA)的饱和溶液,在基质中加入裂解液 2 和缓冲液各 60 μ L 充分混匀而成。

表 1 用于建立和评价巴尔通体菌 MALDI-TOF MS 数据库的菌株信息

巴尔通体亚种	来源	宿主	数据库中的株数(<i>n</i>)	测试菌株(<i>n</i>)	合计
汉赛巴尔通体*	ATCC49882	人	1	0	1
	本研究	猫	22	17	39
杆菌样巴尔通体*	ATCC35685	人	1	0	1
五日热巴尔通体*	ATCCVR-358	人	1	0	1
	本研究	猕猴	12	0	12
伊丽莎白巴尔通体*	ATCC49927	鼠	1	0	1
	本研究	鼠	17	3	20
文森巴尔通体伯格霍夫亚种*	ATCC51672	狗	1	0	1
	本研究	狗	6	1	7
格拉汉姆巴尔通体*	ATCC700132	鼠	1	0	1
	本研究	鼠	24	104	128
科勒巴尔通体*	ATCC700693	猫	1	0	1
克氏巴尔通体*	ATCC700095	猫	1	0	1
	本研究	猫	1	0	1
道志巴尔通体	ATCC700133	鼠	1	0	1
	本研究	鼠	8	2	10
文森巴尔通体文森亚种	ATCCVR-152	鼠	1	0	1
文森巴尔通体阿鲁藩亚种	ATCC700727	鼠	1	0	1
特利波契巴尔通体	CIP105476	鼠	1	0	1
	本研究	鼠	13	8	21
日本巴尔通体	本研究	鼠	13	6	19
黑瞎子巴尔通体	本研究	鼠	6	1	7
昆州巴尔通体	本研究	鼠	7	8	15
森林巴尔通体	本研究	鼠	6	2	8
库珀巴尔通体	本研究	鼠	10	2	12
非洲跳鼠巴尔通体	本研究	鼠	11	4	15
丽松鼠巴尔通体	本研究	鼠	1	0	1
泰勒巴尔通体	本研究	鼠	13	7	20
地松鼠巴尔通体	本研究	鼠	18	8	26
合计	—	—	200	173	373

注: * 表示致病性巴尔通体种; — 表示该项无数据。

1.3 方法

1.3.1 巴尔通体菌株培养和鉴定 巴尔通体菌株在含有 5% 脱纤维羊血 TSA 上复苏培养,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱,潮湿环境中培养。杆菌样巴尔通体在 28 $^{\circ}$ C 条件下,用 10% 脱纤维羊血 TSA 培养。按菌落生长速度收获培养第 4~7 天新鲜菌体。应用引物 BhCS. 781p-BhCS. 1137n 扩增巴尔通体属的特异性基因枸橼酸合酶基因(*gltA*)进行分类鉴定^[10]。

1.3.2 样品预处理及靶板制备 在 1.5 mL 离心管

中加入 300 μ L 去离子水,取适量(5~10 mg)巴尔通体菌株新鲜培养物,漩涡震荡,再加入 900 μ L 无水乙醇充分混匀,检测前置于 -40 $^{\circ}$ C 保存。将上述含样品的保存液 10 000 r/min 离心 2 min,重复离心弃上清液,室温干燥沉淀 2~3 min,加 50 μ L 裂解液 1 漩涡震荡混匀,再加 50 μ L 裂解液 2 混匀,10 000 r/min 离心 2 min,取 1 μ L 上清液,滴加到样品靶上,晾干至样品点无明显水迹,再取 1 μ L 基质溶液(CHCA 饱和溶液)覆盖在样品点上,晾干至样品点无明显水迹。

将同一菌株的样品蛋白溶液滴加到 8 个不同靶位,同时选择 1 个靶位滴加仪器校准品(图 1),干燥后加基质溶液,结晶形成后放入质谱仪,每株菌建库前先进行校准,再进行样品质谱图采集。校准峰值为 3 637. 772、4 365. 343、5 096. 776、5 381. 446、6 255. 444、7 274. 467、10 300. 032、13 683. 173 和 16 952. 332,按照仪器校准要求进行自动校准,达到 4 个峰值符合即为校准成功。



图 1 巴尔通体 MALDI-TOF MS 数据库建库靶板制备示意图

1.3.3 MALDI-TOF MS 参数设置及数据采集 在 Autof Acquirer 软件中选择 Microbe 方法,线性正离子模式,加速电压 20 kV,激光源波长 355 nm,延迟提取时间 250 ns,相对激光强度为 44%,频率为 60 Hz,累加数 40,分子质量检测范围 2 000~20 000,容差 300 ppm;每个靶位采集 3 张谱图,每张谱图由 3 次累加组成,峰强度 4 000~10 000,最终每个菌株获得 24 张图谱。在 Autof Analyzer 软件中设置建库参数,谱图匹配容差 200 ppm,最大峰数目 70 个。

1.3.4 重复性验证 选择 8 种不同宿主、地域来源的巴尔通体,每种包含建库菌株和测试菌株各 1 株进行 MALDI-TOF MS 鉴定的重复性实验。每株菌每次采集 6 个重复靶点质谱得分,共计重复 6 次实验。

1.3.5 野生菌株实测 应用 173 株经测序鉴定为巴尔通体的菌株(表 1)对所建立巴尔通体质谱数据库进行验证。每株用于验证的菌株均采用直接涂抹法(简

称“直涂法”)^[6]和上述提取法准备样品靶板,自动采集谱图。直接涂抹法即用接种针挑取新鲜的单菌落 1~2 个,在靶板上涂抹均匀,干燥后覆盖 1 μL 的基质溶液,晾干至样品点无明显水迹,将样品靶放入质谱仪进行鉴定。依据系统自动搜库结果进行判定,鉴定总分为 10 分,9.500~10.000 分为精确鉴定,9.000~<9.500 分为可靠鉴定,6.000~<9.000 分为可参考鉴定,<6.000 分为无效(不可靠)鉴定。用建库相同的参数条件对细菌进行检测,数据分析系统将会用分值的形式给出被测细菌与质谱库中细菌的匹配情况。

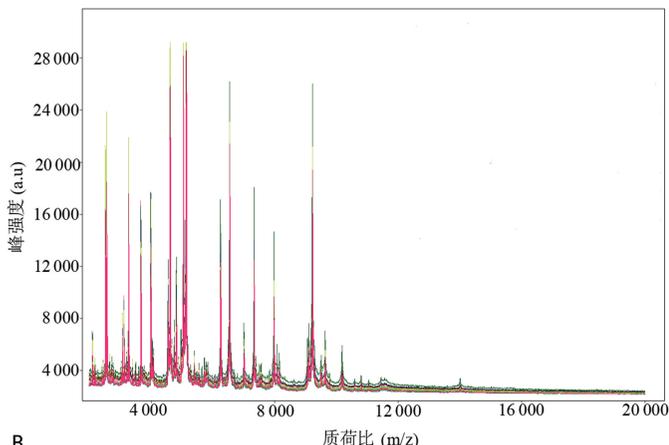
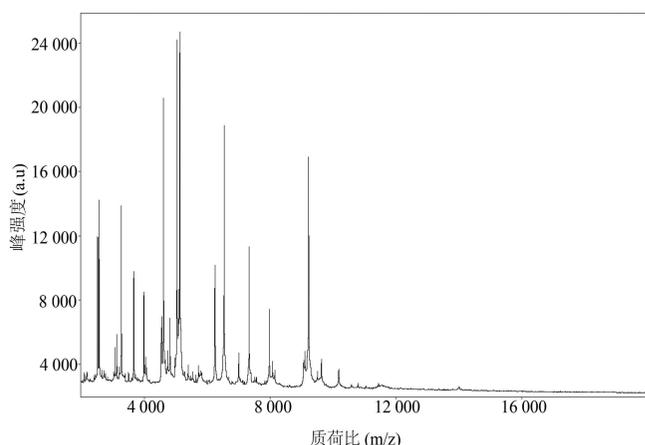
1.3.6 巴尔通体 MALDI-TOF MS 鉴定的特异性验证 选用牛种布鲁氏菌人用疫苗株 104M、犬种布鲁氏杆菌 RM6/66、根瘤土壤杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌各 1 株,对新建巴尔通体数据库进行特异性验证。每株菌每次鉴定时涂布 6 个重复靶点,采集 6 个重复靶点鉴定结果,观察质谱得分及匹配情况。

1.4 统计学处理 两种样品处理方法的质谱得分比较采用两样本 Wilcoxon(Mann-Whitney)秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 巴尔通体 MALDI-TOF MS 数据库建立 应用标准建库方法采集了 200 株巴尔通体的蛋白指纹图谱,包含汉赛、五日热、杆菌样和伊丽莎白巴尔通体等主要致病性巴尔通体,建立了拥有 21 种(包括 3 个亚种)巴尔通体 MALDI-TOF MS 数据库。

这 200 株来自不同地区的巴尔通体菌株在种水平的主要离子峰一致,每株菌 24 次采集峰谱数据稳定,最终形成每个种的巴尔通体标准蛋白指纹图谱,图 2 以汉赛巴尔通体标准菌株为例展示单次质谱图和 24 次叠加图。建库后,每株菌按照样品模式进行谱图采集打靶验证,总得分为(9.631±0.156)分,得分范围为 9.019~9.863 分(表 2),全部大于 9.000 分,属于“可靠”或“精确鉴定”。



注:A 为单次采集质谱图;B 为 24 次采集叠加图。

图 2 汉赛巴尔通体的 MALDI-TOF MS 蛋白指纹图谱

表 2 巴尔通体菌株 MALDI-TOF MS 鉴定结果[范围($\bar{x} \pm s$),分]

种类	数据库菌株	测试菌株
汉赛巴尔通体	9.275~9.805(9.643±0.111)	9.565~9.775(9.646±0.061)
杆菌样巴尔通体	9.751	无样品
五日热巴尔通体	9.111~9.826(9.645±0.173)	无样品
伊丽莎白巴尔通体	9.019~9.772(9.588±0.174)	9.509~9.61(9.568±0.042)
文森巴尔通体伯格霍夫亚种	9.245~9.863(9.654±0.191)	9.598
格拉汉姆巴尔通体	9.048~9.780(9.553±0.172)	9.014~9.660(9.400±0.182)
科勒巴尔通体	9.772	无样品
克氏巴尔通体	9.814~9.517(9.666±0.149)	无样品
道志巴尔通体	9.502~9.824(9.695±0.128)	9.732~9.769(9.751±0.019)
文森巴尔通体文森亚种	9.765	无样品
文森巴尔通体阿鲁藩亚种	9.840	无样品
特利波契巴尔通体	9.275~9.743(9.529±0.144)	9.151~9.687(9.473±0.196)
日本巴尔通体	9.079~9.854(9.616±0.176)	9.557~9.796(9.644±0.078)
黑瞎子巴尔通体	9.630~9.808(9.748±0.064)	9.081
昆州巴尔通体	9.586~9.846(9.785±0.082)	9.067~9.674(9.439±0.180)
森林巴尔通体	9.295~9.854(9.656±0.186)	9.616~9.664(9.64±0.024)
库珀巴尔通体	9.502~9.798(9.616±0.084)	9.596~9.670(9.633±0.037)
非洲跳鼠巴尔通体	9.485~9.775(9.700±0.084)	9.489~9.713(9.605±0.890)
丽松鼠巴尔通体	9.537	无样品
泰勒巴尔通体	9.309~9.767(9.572±0.152)	无样品
地松鼠巴尔通体	9.519~9.811(9.682±0.084)	9.569~9.719(9.665±0.044)
合计	9.019~9.863(9.631±0.156)	9.014~9.796(9.462±0.195)

注:只有单个样品的菌株,未采用范围($\bar{x} \pm s$)表示。

2.2 不同样品处理方法对巴尔通体 MALDI-TOF MS 鉴定结果的影响 应用 2 种不同方法处理 60 株(13 种)巴尔通体菌株,质谱鉴定得分均大于 9.000 分,符合“可靠”或“精确鉴定”。乙醇-甲酸提取法处理细菌培养物再涂板,全部菌株得分为 9.067~9.775 分,直接涂靶得分为 9.016~9.689 分,准确率均为 100%。两种处理方法的质谱得分比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。有 44 株乙醇-甲酸提取法处理后的菌株质谱得分高于直接涂靶法得分(图 3)。

表 3 不同样品处理方法的巴尔通体 MALDI-TOF MS 鉴定结果(分)

种类	菌株 (n)	匹配得分*	
		乙醇-甲酸提取法	直接涂靶
库珀巴尔通体	2	9.596~9.670	9.063~9.183
道志巴尔通体	2	9.732~9.769	9.105~9.593
格拉汉姆巴尔通体	7	9.109~9.606	9.016~9.649
黑瞎子巴尔通体	1	9.081	9.143
汉赛巴尔通体	17	9.565~9.775	9.038~9.689
非洲跳鼠巴尔通体	1	9.665	9.666

续表 3 不同样品处理方法的巴尔通体 MALDI-TOF MS 鉴定结果

种类	菌株 (n)	匹配得分*	
		乙醇-甲酸提取法	直接涂靶
日本巴尔通体	4	9.601~9.665	9.511~9.626
昆州巴尔通体	6	9.067~9.620	9.016~9.362
森林巴尔通体	2	9.306~9.664	9.544~9.553
泰勒巴尔通体	7	9.070~9.491	9.086~9.429
特利波契巴尔通体	2	9.439~9.593	9.249~9.557
文森巴尔通体伯格霍夫亚种	1	9.598	9.680
地松鼠巴尔通体	8	9.569~9.719	9.224~9.657
合计	60	9.067~9.775	9.016~9.689

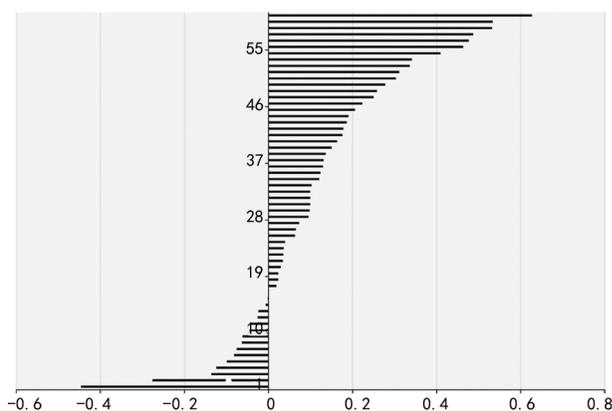
注:*表示两种方法的差异有统计学意义, $Z = -4.366, P \leq 0.001$;只有单个样品的菌株,未采用范围表示。

2.3 重复性实验 8 种、16 株巴尔通体菌株在各自的组内及组间重复实验中质谱得分均 > 9.000 分,均值为(9.078±0.031)~(9.776±0.006)分,均鉴定正确;组间 CV 值在 0.06%~1.12%,实验结果重复性好,质谱得分稳定(表 4)。

表 4 MALDI-TOF MS 鉴定巴尔通体菌株的重复性

种类	菌株名称	来源地	组内得分均值(分)						组间得分均值(分)	标准差 (分)	CV (%)
			靶 1	靶 2	靶 3	靶 4	靶 5	靶 6			
汉赛巴尔通体	M13BJ ^a	北京	9.719	9.724	9.714	9.693	9.668	9.728	9.708	0.023	0.24
	M221HEN ^b	河南	9.786	9.773	9.773	9.770	9.779	9.772	9.776	0.006	0.06
黑瞎子巴尔通体	CR90HXZ ^a	黑龙江	9.372	9.609	9.370	9.446	9.382	9.306	9.414	0.105	1.12
	MA69HLJMS ^b	黑龙江	9.119	9.114	9.246	9.335	9.204	9.240	9.210	0.084	0.91
伊丽莎白巴尔通体	ML172XJH ^a	新疆	9.469	9.458	9.468	9.647	9.414	9.618	9.512	0.096	1.01
	MM80QHGMEM ^b	青海	9.450	9.385	9.371	9.330	9.304	9.286	9.354	0.060	0.64
文森巴尔通体伯格霍夫亚种	Q52SHD ^a	山东	9.721	9.656	9.684	9.619	9.669	9.580	9.655	0.050	0.51
	Q64SHD ^b	山东	9.678	9.672	9.721	9.618	9.567	9.562	9.636	0.065	0.67
格拉汉姆巴尔通体	SD93NMGDW ^a	内蒙古	9.670	9.605	9.728	9.691	9.697	9.697	9.681	0.042	0.43
	TS25HLJMH ^b	黑龙江	9.046	9.055	9.132	9.066	9.095	9.076	9.078	0.031	0.35
日本巴尔通体	AA91HLJMS ^a	黑龙江	9.455	9.571	9.482	9.459	9.611	9.629	9.535	0.079	0.82
	RA6YNQB ^b	云南	9.690	9.644	9.560	9.700	9.669	9.629	9.649	0.051	0.53
地松鼠巴尔通体	SD16HB ^a	河北	9.695	9.675	9.719	9.724	9.693	9.703	9.702	0.018	0.19
	SD17HB ^b	河北	9.490	9.565	9.569	9.500	9.559	9.561	9.541	0.036	0.37
特利波契巴尔通体	RN26SBJ ^a	北京	9.610	9.643	9.652	9.624	9.633	9.566	9.621	0.031	0.32
	RN12BJ ^b	北京	9.513	9.596	9.608	9.581	9.560	9.568	9.571	0.033	0.35

注：^a 表示数据库菌株；^b 表示测试菌株。



注：纵坐标为样品编号；横坐标为差值(分)。

图 3 应用 2 种方法处理的巴尔通体菌株质谱得分差值分布图

2.4 巴尔通体 MALDI-TOF MS 数据库验证 将 14 种、173 株巴尔通体菌株培养后用乙醇-甲酸提取法处理,基于新建的巴尔通体数据库进行质谱鉴定。这 173 株菌已通过 *gltA* 基因扩增、测序鉴定到种水平。173 株测试菌株全部鉴定到巴尔通体种水平,总得分为 9.014~9.796 分,平均(9.462±0.195)分,全部菌株得分均>9.000 分(图 4),准确率为 100%。以菌株 M59SHD 为例,质谱鉴定结果前 10 位均为数据库中的汉赛巴尔通体菌株,得分为 9.505~9.642 分,匹配最高分为 ATCC 标准菌株(图 5)。

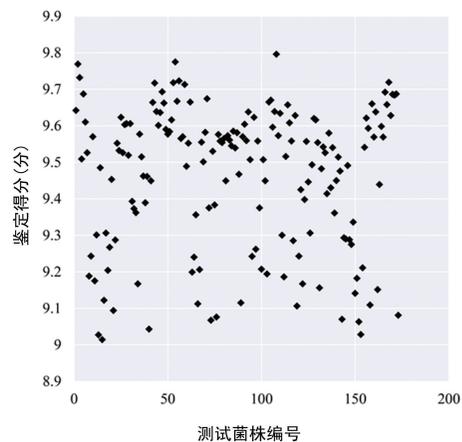
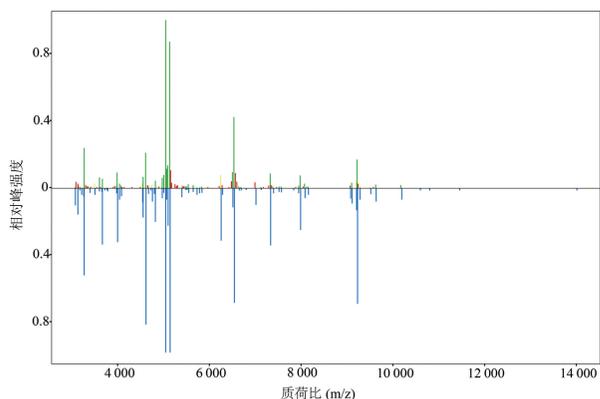


图 4 173 株巴尔通体测试菌株质谱得分图

2.5 巴尔通体 MALDI-TOF MS 鉴定的特异性验证 牛种布鲁氏菌人用疫苗株 104M 的质谱得分为 6.136~7.809 分,平均(6.705±0.662)分,匹配第 1 位菌株为犬种布鲁氏菌;犬种布鲁氏菌 RM6/66 的质谱得分为 6.162~7.633 分,平均(7.104±0.592)分,匹配第 1 位菌株为犬种布鲁氏菌;根癌土壤杆菌质谱得分结果为 6.123~8.215 分,平均(6.751±0.764)分,匹配第 1 位菌株为放射根瘤菌;金黄色葡萄球菌质谱得分为 9.018~9.372 分,平均(9.103±0.135)分,大肠埃希菌的质谱得分为 9.214~9.598 分,平均(9.453±0.135)分。在这 5 种细菌每个重复靶点的匹配结果中,前 10 位均未出现巴尔通体属细菌。



注:水平轴上下分别为测试菌株 M59SHD 和新建数据库中汉赛巴尔通体的 ATCC 标准菌株。

图 5 汉赛巴尔通体菌株 M59SHD 质谱鉴定匹配图

3 讨论

MALDI-TOF MS 无疑是近年在临床实验室应用于诊断感染性疾病最成功的生物化学技术之一。MALDI-TOF MS 主要用来鉴定已培养出的细菌和真菌,某些生物样品如尿液等不经培养简单预处理后也可直接进行质谱检测。从 1975 年 ANHALT 等^[11]首次提出用质谱技术鉴定细菌,到 1999 年 HOLLAND 等^[12]首次报道应用无须预处理的全菌蛋白进行质谱分析,实现了复杂技术简单化、快速化和结果读取“傻瓜化”的转变,奠定了该技术快速普及的基础。此后,大量相关研究陆续开展,并于 21 世纪开始将此项技术应用于临床实验室。FREIWALD 等^[13]的“细菌质谱系统发育分类和鉴定”的实验手册提供了详尽的操作流程和说明,CLARK 等^[14]详细综述了 MALDI-TOF MS 用于各种革兰阳性和阴性细菌、厌氧菌、苛养菌和各种真菌鉴定的研究,他们都指出这一技术将替代部分传统方法,皆归因于其特异、快速、稳定和低成本的优点。

操作简便、快速和准确使得 MALDI-TOF MS 技术在临床应用上很受欢迎,只需把菌培养出来,菌量无须过多、单个菌落即可,直接涂抹在靶面上,装载到仪器中,简单按几次鼠标,1 min 内结果就展示出来。对于巴尔通体这种苛养菌,没有表型特征、没有生化代谢特异反应,目前只能通过 PCR 测序进行鉴定,建立质谱鉴定方法将极大推动临床实验室对这类细菌的识别能力。

MALDI-TOF MS 识别细菌体内稳定且丰富的核糖体蛋白,相对分子质量在 2 000~20 000^[15-16],因此,相较于其他化学分类法如细胞壁脂肪酸法,不易受培养条件的影响,全菌蛋白质谱峰信号稳定,有利于鉴定和比较。依据常规方法,本课题组选取了统一培养条件下平板上稳定生长期的菌落,通常为培养 4~6 d,但有些种类如杆菌样巴尔通体生长更为缓慢,

这也使得一切基于菌落培养的鉴定方法检测速度降低,成为 MALDI-TOF MS 鉴定巴尔通体的限速步骤,也是该方法的局限性所在。不过一旦平板上开始出现菌落就可以快速完成鉴定。

对于一般生长在固体琼脂平板上的细菌,直接涂靶是常规做法,有效地节省了中间步骤、试剂和操作过程中增加污染的可能性,是最简单、快速有效的方法,在临床实验室中广泛应用。但是,在某些细菌或特殊菌株的鉴定时,乙醇-甲酸或者乙酸-乙腈等提取法可以增加细菌蛋白的裂解质量,提高鉴定准确率^[5]。巴尔通体菌落小但是形态多样,有些干燥,有些向琼脂平板下陷生长,还有些黏滑不易挑取,一次直涂操作不易成功,这种情况下采用提取法是较好的解决办法。

准确的诊断要求鉴定方法的稳定性,除了稳定的设备、优化的实验条件和良好的操作技术,MALDI-TOF MS 技术对参考菌株库的需求是这一技术的特点之一^[17]。在 MALDI-TOF MS 微生物数据库中不同来源的流行菌株越多,在临床诊断中对未知菌株的命中率越高,否则可能因匹配得分低导致鉴定失败。本课题组建立的巴尔通体 MALDI-TOF MS 数据库菌种和菌株数量多、来源广泛,不同来源地和不同宿主来源没有影响巴尔通体在种属水平上的准确鉴定。应用 8 种、16 株巴尔通体进行的重复性实验获得良好测试效果,符合率达到 100%,表明 MALDI-TOF MS 技术可以稳定、准确地种水平鉴定巴尔通体。野生菌株的鉴定结果是评价数据库质量最有说服力的数据,与 FOURNIER 等^[9]的研究相比,本研究的建库菌株不仅更多(21 种/亚种 *vs.* 17 种,200 株 *vs.* 17 株),而且用于测试的野生菌株数量增加了 4 倍(173 株 *vs.* 39 株),可以更有效地验证和评估所建巴尔通体质谱数据库和技术方法的可靠性。经重复性实验测试,质谱得分均>9.000 分,CV 值显示组内和组间测量值变异非常小,实验组内和组间上样进行谱图采集均不会影响鉴定结果,方法稳定。Autof ms1000 全自动微生物质谱检测系统中已有细菌 4 000 余种,没有巴尔通体属细菌。在建库前,为观察是否存在非特异性鉴定结果的情况,本课题组进行了巴尔通体菌株打靶搜库,未发现非特异鉴定的高分结果,表明原始库中 4 000 余种细菌对巴尔通体鉴定无干扰,不存在非特异性鉴定可能。进一步对近源菌包括布鲁氏菌和根瘤土壤杆菌的鉴定结果表明,用 MALDI-TOF MS 方法鉴定巴尔通体不会发生非特异性的识别错误,基于新建巴尔通体数据库可以特异性地辨别巴尔通体属细菌。限于巴尔通体菌种、菌株资源有限,本研究未能将目前已知的全部巴尔通体种类涵盖进去,

而且有些种类菌株数量较少,该数据库并不完善,在未来使用过程中可能导致某些巴尔通体种类鉴定不到种水平,或者种水平鉴定错误。这种情况实际上是质谱技术用于细菌鉴定时的共同问题,这一局限性有待通过不断向数据库中补充菌种和菌株数据来解决。

本课题组完成了 21 种/亚种巴尔通体标准质谱图,构建了巴尔通体标准质谱数据库,可用于巴尔通体菌株的种属水平鉴定。最后,为便于有关专业实验室研究人员和临床检验医师参考和交流,笔者提出“巴尔通体质谱鉴定标准化操作流程”的建议,包括菌株分离培养、样品处理和自动化质谱分析(图 6)。简述如下,第 1 步:在 37 °C、5%CO₂、湿度>70%培养条件下,复苏培养巴尔通体菌株,4~6 d;第 2 步:直涂法或者乙醇-甲酸提取法制备质谱样品,1~10 min;第 3 步:靶板上样并装载到质谱仪,3 min;第 4 步:设置参数、编辑样品表单、采集图谱鉴定并输出结果,<1 min。

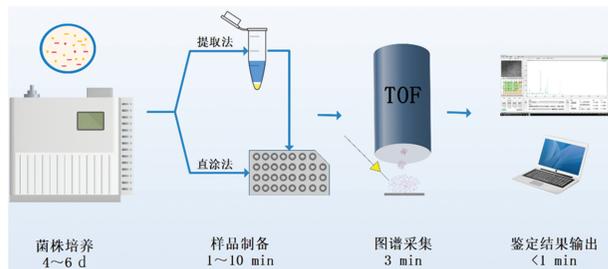


图 6 巴尔通体质谱鉴定标准化操作流程示意图

参考文献

[1] BREITSCHWERDT E B, KORDICK D L. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection[J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(3):428.

[2] BREITSCHWERDT E B. Bartonellosis, one health and all creatures great and small[J]. Vet Dermatol, 2017, 28(1): 96-121.

[3] BUFFET J P, KOSOY M, VAYSSIER-TAUSSAT M. Natural history of *Bartonella*-infecting rodents in light of new knowledge on genomics, diversity and evolution[J]. Future Microbiol, 2013, 8(9):1117-1128.

[4] SCHUBERT S, KOSTRZEWA M. MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory: current trends[J]. Curr Issues Mol Biol, 2017, 23:17-20.

[5] VAN BELKUM A, WELKER M, PINCUS D, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: what are the

current issues[J]. Ann Lab Med, 2017, 37(6):475-483.

[6] 胡继红, 马筱玲, 王辉, 等. MALDI-TOF MS 在临床微生物鉴定中的标准化操作专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(4):241-249.

[7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for the identification of cultured microorganisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[M]. Wayne, PA: CLSI, 2017.

[8] 中国国家标准化管理委员会, 中华人民共和国质量监督检验检疫总局. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴别微生物方法通则: GB/T 33682—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.

[9] FOURNIER P E, COUDERC C, BUFFET S, et al. Rapid and cost-effective identification of *Bartonella* species using mass spectrometry[J]. J Med Microbiol, 2009, 58(9):1154-1159.

[10] NORMAN A F, REGNERY R, JAMESON P, et al. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(7): 1797-1803.

[11] ANHALT J P A C. Identification of bacteria using mass spectrometry[J]. Anal Chem, 1975, 47:219-225.

[12] HOLLAND R D, DUFFY C R, RAFII F, et al. Identification of bacterial proteins observed in MALDI TOF mass spectra from whole cells[J]. Anal Chem, 1999, 71(15): 3226-30.

[13] FREIWALD A, SAUER S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry[J]. Nat Protoc, 2009, 4(5):732-742.

[14] CLARK A E, KALETA E J, ARORA A, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology[J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(3):547-603.

[15] RYZHOV V, FENSELAU C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells[J]. Anal Chem, 2001, 73(4):746-750.

[16] HSIEH S Y, TSENG C L, LEE Y S, et al. Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS[J]. Mol Cell Proteomics, 2008, 7(2):448-456.

[17] 罗燕萍, 徐英春, 王辉, 等. 自建 MALDI-TOF MS 微生物鉴定数据库专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(6):414-419.