

· 方法学研究 ·

飞行时间质谱系统微生物样本处理试剂与 Bruker 样本处理基质预处理对病原菌鉴定效能的影响研究

马庆伟¹, 周凤丽¹, 战晓微¹, 王莉莉¹, 刘昕超¹, 曲芬², 曹峰林³

【摘要】 目的 比较飞行时间质谱系统微生物样本处理试剂 (Clin-TOF 试剂) 与 Bruker 样本处理基质液 (Bruker 基质液) 预处理对病原菌鉴定效能的影响。方法 选取 2017 年 1—5 月中国人民解放军第 302 医院临床常规分离的菌株 103 株, 其中革兰阴性菌 36 株、革兰阳性菌 33 株、真菌 34 株。分别采用 Clin-TOF 试剂和 Bruker 基质液预处理后在 Clin-TOF- II 型基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MS) 系统和布鲁克基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (Bruker Microflex MS) 系统上进行菌种鉴定。结果 在 Clin-TOF- II 型 MS 系统上, 采用 Clin-TOF 试剂预处理供试菌株后所得质谱图基线平滑, 特征信号较多, 信噪比较高, 重现性较好, 且对较难鉴定的新型隐球菌也能检测出特征信号; 采用 Bruker 基质液预处理供试菌株后所得质谱图特征信号较少, 信噪比较低, 重现性较差。在 Clin-TOF- II 型 MS 系统上, Clin-TOF 试剂预处理和 Bruker 基质液预处理后革兰阴性菌单次鉴定准确率、3 次平行实验鉴定准确率及真菌 3 次平行实验鉴定准确率比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); Clin-TOF 试剂预处理后革兰阳性菌单次鉴定准确率、3 次平行实验鉴定准确率及真菌单次鉴定准确率高于 Bruker 基质液预处理 ($P<0.05$)。在 Bruker Microflex MS 系统上, Clin-TOF 试剂预处理和 Bruker 基质液预处理后革兰阴性菌单次鉴定准确率、3 次平行实验鉴定准确率, 革兰阳性菌单次鉴定准确率、3 次平行实验鉴定准确率, 真菌单次鉴定准确率比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); Clin-TOF 试剂预处理后真菌 3 次平行实验鉴定准确率高于 Bruker 基质液预处理 ($P<0.05$)。结论 与 Bruker 基质液相比, 采用 Clin-TOF 试剂预处理供试菌株后 Clin-TOF- II 型 MS 系统对革兰阳性菌及真菌的鉴定准确率较高, Bruker Microflex MS 系统对真菌的鉴定准确率较高。

【关键词】 飞行时间质谱系统微生物样本处理试剂; Bruker 样本处理基质液; 基质辅助激光解吸-电离质谱图; 鉴定

【中图分类号】 R 313 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2018.04.011

马庆伟, 周凤丽, 战晓微, 等. 飞行时间质谱系统微生物样本处理试剂与 Bruker 样本处理基质预处理对病原菌鉴定效能的影响研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2018, 26 (4): 50-53. [www.syxnf.net]

MA Q W, ZHOU F L, ZHAN X W, et al. Impact of pre-processing on pathogen identification efficiency: a comparison between Microorganism Sample Processing Reagent for Flight Time Mass Spectrometry System and Bruker Sample Processing Matrix [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2018, 26 (4): 50-53.

Impact of Pre-processing on Pathogen Identification Efficiency: a Comparison between Microorganism Sample Processing Reagent for Flight Time Mass Spectrometry System and Bruker Sample Processing Matrix MA Qing-wei¹, ZHOU Feng-li¹, ZHAN Xiao-wei¹, WANG Li-li¹, LIU Xin-chao¹, QU Fen², CAO Feng-lin³

1. *Biyong Technologies Inc., Beijing 102206, China*

2. *Clinical Laboratory Medical Center, the 302nd Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Beijing 100039, China*

3. *Central Laboratory, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China*

Corresponding author: QU Fen, E-mail: qf302@163.com CAO Feng-lin, E-mail: cfl023@163.com

【Abstract】 Objective To compare the impact of pre-processing on pathogen identification efficiency between Microorganism Sample Processing Reagent for Flight Time Mass Spectrometry System (Clin-TOF Reagent) and Bruker Sample Processing Matrix (Bruker Matrix). **Methods** A total of 103 routinely isolated bacterial strains were selected in the 302nd Hospital of the Chinese People's Liberation Army from January 2017 to May 2017, including 36 strains of Gram-negative bacteria, 33 strains of Gram-positive bacteria and 34 strains of fungus. All of the bacterial strains were identified by Clin-TOF- II type MS and Bruker Microflex MS after pre-processing of Clin-TOF Reagent and Bruker Matrix, respectively.

1.102206 北京市, 北京毅新博创生物科技有限公司

2.100039 北京市, 中国人民解放军第 302 医院临床检验医学中心

3.150001 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第一医院中心实验室

通信作者: 曲芬, E-mail: qf302@163.com 曹峰林, E-mail: cfl023@163.com

Results On Clin-TOF- II type MS, after pre-processing of Clin-TOF Reagent, baseline of mass spectrum was smooth, with relatively more specific signals, relatively high signal-to-noise ratio and better reproducibility, meanwhile it showed specific signals for *Cryptococcus neoformans* which were difficult to identify; after pre-processing of Bruker Matrix, the specific signals were less, the signal-to-noise ratio was lower, with poor reproducibility. On Clin-TOF- II type MS, no statistically significant differences of single identification accuracy rate or 3-time parallel test identification accuracy rate of Gram-negative bacteria, or 3-time parallel test identification accuracy rate of fungus was found between pre-processing of Clin-TOF Reagent and pre-processing of Bruker Matrix ($P>0.05$), while single identification accuracy rate and 3-time parallel test identification accuracy rate of Gram-positive bacteria, and single identification accuracy rate of fungus after pre-processing of Clin-TOF Reagent were statistically significantly higher than those after pre-processing of Bruker Matrix ($P<0.05$). On Bruker Microflex MS, no statistically significant differences of single identification accuracy rate or 3-time parallel test identification accuracy rate of Gram-negative bacteria or Gram-positive bacteria, or single identification accuracy rate of fungus was found between pre-processing of Clin-TOF Reagent and pre-processing of Bruker Matrix ($P>0.05$), while 3-time parallel test identification accuracy rate of fungus after pre-processing of Clin-TOF Reagent was statistically significantly higher than that after pre-processing of Bruker Matrix ($P<0.05$). **Conclusion** Compared with Bruker Matrix, pre-processing of Clin-TOF Reagent has higher identification accuracy rate of Gram-positive bacteria and fungus on Clin-TOF- II type MS, has higher identification accuracy rate of fungus on Bruker Microflex MS.

【Key words】 Microorganism sample processing reagent for flight time mass spectrometry system; Bruker sample processing matrix; Matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry; Identification

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (Matrix-assisted Laser Desorption-ionization Time-of-flight Mass Spectrometry, MS) 技术是近年来发展起来的鉴定病原微生物的新技术, 可通过对供试病原微生物蛋白指纹图谱进行同源分析而快速鉴定菌种, 对疾病诊断具有重要意义^[1-4]。与传统病原微生物鉴定方法相比, MS 技术具有灵敏度较高、准确率较高、耗能较低、高通量等优点。目前, 临床微生物实验室使用的 MS 系统多为德国布鲁克基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (Bruker Microflex MS) 系统和法国梅里埃公司的 Vitek 质谱系统, 但进口质谱仪价格昂贵, 一次性投入成本较高。国产 Clin-TOF- II 型 MS 系统及其配套的飞行时间质谱系统微生物样本处理试剂 (Clin-TOF 试剂) 在价格和临床鉴定准确率方面均具有优势。本研究旨在比较 Clin-TOF 试剂与 Bruker 样本处理基质液 (Bruker 基质液) 预处理对病原菌鉴定效能的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 选取 2017 年 1—5 月中国人民解放军第 302 医院临床常规分离的菌株 103 株, 其中革兰阴性菌 36 株、革兰阳性菌 33 株、真菌 34 株, 均置于 -80°C 冰箱中保存待测。

1.2 试剂与仪器 Clin-TOF- II 型 MS 系统及其配套 Clin-TOF 试剂购自北京毅新博创生物科技有限公司, Bruker Microflex MS 系统购自德国布鲁克·道尔顿公司, Bruker 基质液根据 Bruker 配方配制。

1.3 方法

1.3.1 菌株传代 将常规分离的 103 株菌株置于固体培养基上进行三区划线, 用接种环挑取单菌落。

1.3.2 仪器校正 检测前使用大肠杆菌 ATCC8739 单菌落 (购自中国工业微生物菌种保藏管理中心) 为标准品进行仪器校正, 严格按照仪器使用说明书进行操作。

1.3.3 Clin-TOF 试剂预处理供试菌株 每个离心管 ($200\ \mu\text{l}$) 中加入 $30\ \mu\text{l}$ 组分 I, 采用无菌接种环或枪头挑取单菌落放于离心管中, 震荡混匀 5 min, 加 $1\ \mu\text{l}$ 样品到靶板上, 自然

干燥后加 $1\ \mu\text{l}$ 组分 II, 覆盖在样品点上, 自然干燥后分别使用 Clin-TOF- II 型 MS 系统和 Bruker Microflex MS 系统采集图谱并进行鉴定, 每个菌株平行检测 3 次。

1.3.4 Bruker 基质液预处理供试菌株 无菌牙签挑取样品单菌落均匀抹在 Macro 96 孔靶板上, 自然干燥后在样品点上覆盖 $1\ \mu\text{l}$ Bruker 基质液, 自然干燥后分别使用 Clin-TOF- II 型 MS 系统和 Bruker Microflex MS 系统采集图谱并进行鉴定, 每个菌株平行检测 3 次。

1.4 结果判定 Clin-TOF- II 型 MS 系统: 置信度 ≥ 25.0 分为鉴定结果可信; 置信度为 $20.0 \sim 24.9$ 分需通过其他实验进行验证, 选出最终鉴定结果; 置信度 < 20.0 分为鉴定结果不可靠, 建议重新处理菌株或重新采集样品点测试。Bruker Microflex MS 系统鉴定分值 $2.300 \sim 3.000$ 为鉴定在种水平完全可靠; 分值 $2.000 \sim 2.299$ 为鉴定在属水平可信; 分值 $1.700 \sim 1.999$ 为鉴定在属水平有可能。所有菌株经 16S rRNA 扩增测序进行验证。

1.5 统计学方法 应用 SPSS 10.0 统计软件进行数据处理, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用两独立样本 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

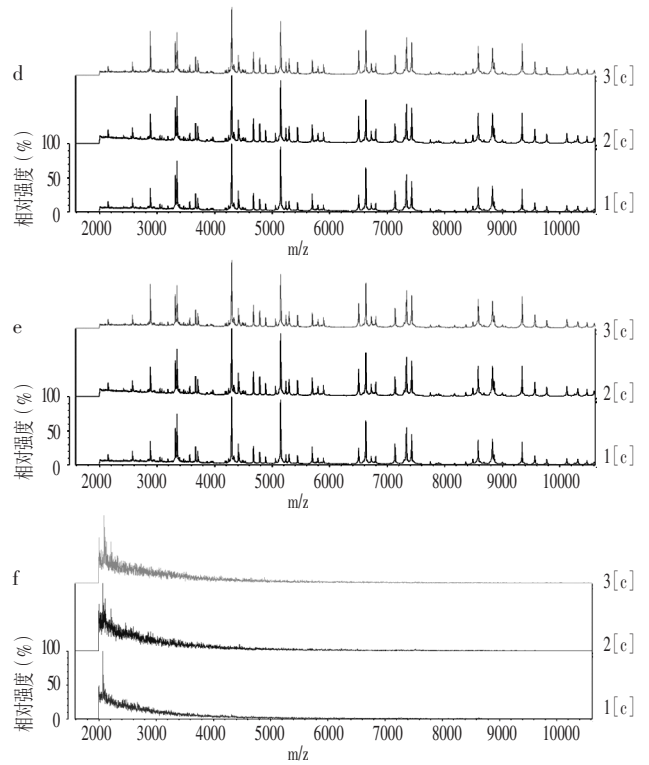
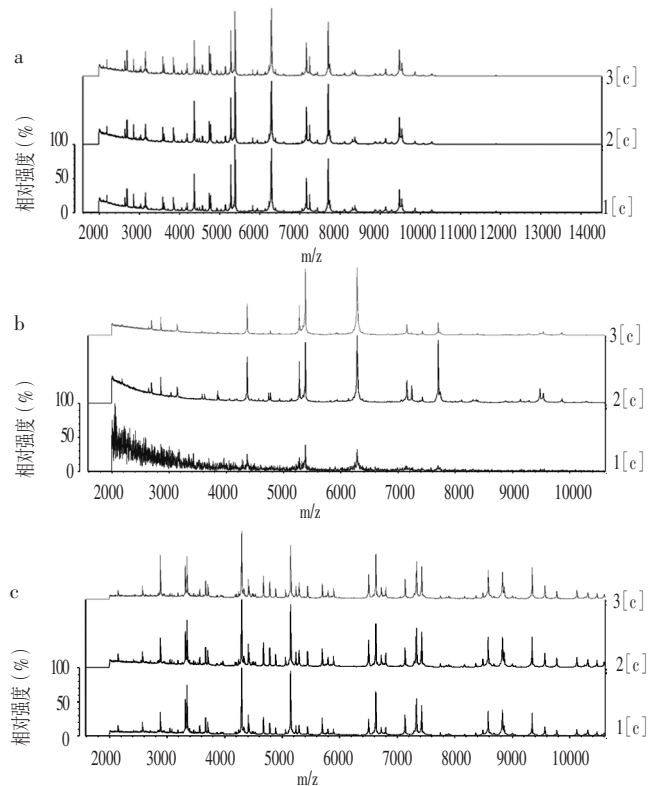
2 结果

2.1 菌株情况 革兰阴性菌 36 株, 其中产酸克雷伯菌 5 株、肺炎克雷伯菌 3 株、摩氏摩根菌 3 株、黏质沙雷菌 3 株、阴沟肠杆菌 3 株、鲍曼不动杆菌 2 株、铜绿假单胞菌 2 株、液化沙雷菌 2 株、嗜麦芽窄食单胞菌 2 株、副溶血弧菌 2 株、流感嗜血杆菌 2 株、皮特不动杆菌 1 株、弗劳地柠檬酸杆菌 1 株、大肠埃希菌 1 株、产气肠杆菌 1 株、奇异变形菌 1 株、施氏假单胞菌 1 株、腐败希瓦菌 1 株。革兰阳性菌 33 株, 其中纹带棒杆菌 2 株、鸟肠球菌 1 株、铅黄肠球菌 1 株、小肠肠球菌 1 株、粪肠球菌 2 株、屎肠球菌 1 株、单核增生李斯特菌 2 株、藤黄微球菌 2 株、空间罗菌 1 株、无乳链球菌 2 株、表皮葡萄球菌 2 株、溶血葡萄球菌 2 株、人葡萄球菌 1 株、

金黄色葡萄球菌 2 株、停乳链球菌 2 株、路邓葡萄球菌 2 株、腐生葡萄球菌 1 株、沃氏葡萄球菌 2 株、解没食子酸链球菌 1 株、口腔链球菌 2 株、唾液链球菌 1 株。真菌 34 株，其中白色假丝酵母菌 2 株、链状假丝酵母菌 3 株、光滑假丝酵母菌 2 株、希木龙假丝酵母菌 3 株、平常假丝酵母菌 3 株、葡萄牙假丝酵母菌 3 株、*Candida nivariensis* 3 株、近平滑假丝酵母菌 3 株、热带假丝酵母菌 1 株、罗伦隐球菌 3 株、新型隐球菌 1 株、东方伊萨酵母 1 株、奥默柯达菌 1 株、异常毕赤酵母 1 株、费比恩毕赤酵母 1 株、季也蒙毕赤酵母 1 株、胶红酵母菌 1 株、阿萨希丝孢酵母菌 1 株。

2.2 质谱图 在 Clin-TOF- II 型 MS 系统上，采用 Clin-TOF 试剂预处理供试菌株后所得质谱图基线平滑，特征信号较多，信噪比较高，重现性较好；对较难鉴定的新型隐球菌也能检测出特征信号。使用 Bruker 基质液预处理供试菌株后，所得质谱图特征信号较少，信噪比较低，多次点样后质谱图重现性较差，见图 1。

2.3 菌株鉴定结果 在 Clin-TOF- II 型 MS 系统上，Clin-TOF 试剂预处理和 Bruker 基质液预处理后革兰阴性菌单次鉴定准确率、3 次平行鉴定准确率及真菌 3 次平行鉴定准确率比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)；Clin-TOF 试剂预处理后革兰阳性菌单次鉴定准确率、3 次平行鉴定准确率及真菌单次鉴定准确率高于 Bruker 基质液预处理，差异有统计学意义 ($P<0.05$ ，见表 1)。在 Bruker Microflex MS 系统上，Clin-TOF 试剂预处理和 Bruker 基质液预处理后革兰阴性菌单次鉴定准确率、3 次平行鉴定准确率，革兰阳性菌单次鉴定准确率、3 次平行鉴定准确率，真菌单次鉴定准确率比较，差异无



注：a 为 Clin-TOF 试剂处理后，肺炎克雷伯菌在 Clin-TOF- II 型 MS 系统上的出峰情况；b 为 Bruker 基质液处理后，肺炎克雷伯菌在 Clin-TOF- II 型 MS 系统上的出峰情况；c 为 Clin-TOF 试剂处理后，空间罗菌在 Clin-TOF- II 型 MS 系统上的出峰情况；d 为 Bruker 基质液处理后，空间罗菌在 Clin-TOF- II 型 MS 系统上的出峰情况；e 为 Clin-TOF 试剂处理后，新型隐球菌在 Clin-TOF- II 型 MS 系统上的出峰情况；f 为 Bruker 基质液处理后，新型隐球菌在 Clin-TOF- II 型 MS 系统上的出峰情况

图 1 Clin-TOF 试剂和 Bruker 基质液预处理供试菌株后 Clin-TOF- II 型 MS 系统质谱图
Figure 1 Mass spectrogram of Clin-TOF- II type MS after pre-processing of Clin-TOF Reagent and Bruker Matrix

统计学意义 ($P>0.05$)；Clin-TOF 试剂预处理后真菌 3 次平行鉴定准确率高于 Bruker 基质液预处理，差异有统计学意义 ($P<0.05$ ，见表 2)。

3 讨论

质谱图的稳定性和重现性是微生物获得准确鉴定结果的重要影响因素。微生物蛋白指纹图谱的峰型分布受多种因素影响，如培养基、培养时间、处理方法、基质配方等^[5-6]。既往研究结果显示，不同基质配方会影响质谱仪出峰情况^[7]，分析其原因可能与细菌和真菌细胞壁的主要成分及不同菌种细胞壁厚度不同有关。细菌细胞壁的主要成分为肽聚糖，革兰阳性菌的细胞壁厚度为 20 ~ 80 nm，革兰阴性菌的细胞壁厚度为 10 ~ 15 nm；真菌细胞壁的主要成分为几丁质和葡聚糖，厚度为 100 ~ 250 nm^[8]。因此，选择合适的基质配方是成功使用 MS 技术的关键。基质的主要作用是吸收能量传递给样品分子，并保护样品分子不被强烈的激光破坏，减弱样品分子间的相互作用。目前，MS 常用的基质配方包括 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA)、2, 5-二羟基苯甲酸 (DHB)、葱三

表1 不同预处理试剂预处理供试菌株后 Clin-TOF- II 型 MS 系统鉴定结果比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

预处理试剂	革兰阴性菌		革兰阳性菌		真菌	
	单次鉴定准确率	3次平行鉴定准确率	单次鉴定准确率	3次平行鉴定准确率	单次鉴定准确率	3次平行鉴定准确率
Clin-TOF 试剂	100.00 ± 0.00	92.59 ± 3.00	100.00 ± 0.00	97.98 ± 2.02	100.00 ± 0.00	98.04 ± 1.96
Bruker 基质液	100.00 ± 0.00	96.30 ± 2.21	87.88 ± 5.31	82.83 ± 5.55	64.71 ± 8.32	58.82 ± 8.09
<i>t</i> 值	0.000	-1.021	2.101	2.392	4.243	4.710
<i>P</i> 值	1.000	0.311	0.044	0.022	<0.001	3.468

表2 不同预处理试剂处理供试菌株后 Bruker Microflex MS 系统鉴定结果比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

预处理试剂	革兰阴性菌		革兰阳性菌		真菌	
	单次鉴定准确率	3次平行鉴定准确率	单次鉴定准确率	3次平行鉴定准确率	单次鉴定准确率	3次平行鉴定准确率
Clin-TOF 试剂	100.00 ± 0.00	92.59 ± 2.69	100.00 ± 0.00	97.98 ± 2.02	85.29 ± 6.16	83.33 ± 6.33
Bruker 基质液	100.00 ± 0.00	94.44 ± 2.48	93.94 ± 4.35	91.92 ± 4.36	70.59 ± 7.93	60.78 ± 7.89
<i>t</i> 值	0.000	-0.505	1.437	1.261	1.464	2.228
<i>P</i> 值	1.000	0.615	0.160	0.214	0.148	0.029

酚 (DI)、阿魏酸 (FA)、3- 吡啶丙烯酸 (IAA)、维 A 酸 (RA)、2, 4, 6- 三羟基苯乙酮 (THAP) 等^[9]。Clin-TOF 试剂是根据细菌和真菌细胞壁的特点对预处理基质配方进行优化, 利于细胞破壁, 降低了人为配置预处理试剂导致的误差, 提高了质谱图的稳定性及微生物鉴定准确率。本研究使用的 Clin-TOF 试剂包括组分 I 和组分 II, 经 Clin-TOF 试剂预处理后微生物蛋白指纹图谱特征峰更多, 基线平滑, 信噪比较高, 有助于获得更稳定的鉴定结果。

本研究比较了 Clin-TOF 试剂与 Bruker 基质预处理对病原菌鉴定效能的影响, 结果显示, 在 Clin-TOF- II 型 MS 系统上, Clin-TOF 试剂预处理后革兰阳性菌单次鉴定准确率、3 次平行鉴定准确率及真菌单次鉴定准确率高于 Bruker 基质液预处理; 在 Bruker Microflex MS 系统上, Clin-TOF 试剂预处理后真菌 3 次平行鉴定准确率高于 Bruker 基质液预处理; 提示与 Bruker 基质液相比, 采用 Clin-TOF 试剂预处理供试菌株后 Clin-TOF- II 型 MS 系统对革兰阳性菌及真菌鉴定准确率较高, Bruker Microflex MS 系统对真菌鉴定准确率较高, 分析其原因可能与 Clin-TOF 试剂有助于菌体蛋白成分释放有关。

综上所述, 与 Bruker 基质液相比, 采用 Clin-TOF 试剂预处理供试菌株后 Clin-TOF- II 型 MS 系统对革兰阳性菌及真菌鉴定准确率较高, Bruker Microflex MS 系统对真菌鉴定准确率较高。此外, 采用 Clin-TOF- II 型 MS 系统及其配套 Clin-TOF 试剂具有准确、灵敏、快速、高通量等优点, 解决了临床微生物鉴定工作成本高、周期长、重复性差等问题, 对微生物鉴定工作具有重要意义。

参考文献

[1] MENG Q, GE S, YAN W, et al. Screening for potential serum-based proteomic biomarkers for human type 2 diabetes mellitus using MS [J]. *Proteomics Clin Appl*, 2017, 11 (3/4). DOI: 10.1002/prca.201600079.

[2] JIA K, LI W, WANG F, et al. Novel circulating peptide biomarkers for esophageal squamous cell carcinoma revealed by a magnetic bead-based MS assay [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (17): 23569-23580. DOI: 10.18632/oncotarget.8123.

[3] ZHANG Y, LIU Y, MA Q, et al. Identification of Lactobacillus from the Saliva of Adult Patients with Caries Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (8): e106185. DOI: 10.1371/journal.pone.0106185.

[4] 任雯, 陈峰, 张翼飞, 等. MALDI-TOF 质谱技术鉴定龋病患者唾液中的变异链球菌 [J]. *北京大学学报医学版*, 2014, 46 (1): 25-29. DOI: 10.3969/j.issn.1671-167X.2014.01.005.

[5] HSIEH S Y, CHEN R K, PAN Y H, et al. Systematical evaluation of the effects of sample collection procedures on low-molecular-weight serum/plasma proteome profiling [J]. *Proteomics*, 2006, 6 (10): 3189-3198. DOI: 10.1002/pmic.200500535.

[6] 黄迎波, 周慧平, 莫瑾, 等. MALDI-TOF-MS 鉴定水稻细菌性叶鞘褐腐病菌的方法研究 [J]. *植物检疫*, 2014, 6: 54-58. DOI: 10.3969/j.issn.1005-2755.2014.06.011.

[7] 康琳, 李楠, 王景林. 基于 MALDI-TOF 质谱蛋白质指纹图谱库的建立及其微生物的快速鉴定 // 转型期的中国公共卫生: 机遇挑战与对策——中华预防医学会第三届学术年会暨中华预防医学科学技术奖颁奖大会, 世界公共卫生联盟第一届西太区公共卫生大会, 全球华人公共卫生协会第五届年会论文集 [C]. 2009.

[8] ALCAMO I E. 微生物学 (全美经典学习指导系列) [M]. 林雅兰, 宋怡玲, 洪龙, 等译. 北京: 科学出版社, 2002.

[9] 王晓青, 陈栓虎. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在聚合物表征中的应用 [J]. *质谱学报*, 2008, 29 (1): 51-59.

(收稿日期: 2017-09-26; 修回日期: 2018-02-15)

(本文编辑: 谢武英)