

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.04.07

百日咳鲍特菌 MALDI-TOF MS 谱库的扩展及鉴定效果评价

郗春花^a, 刘亚敏^b, 李颖^b, 王玥^a, 吴红章^a, 孟超^a(天津市第二人民医院 a.检验科, b.感染科, 天津 300192)

摘要:目的 对基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术鉴定百日咳鲍特菌谱库进行扩展。方法 采用 Microflex LT 软件,用经全基因组测序确认的 9 株百日咳鲍特菌和 1 株副百日咳鲍特菌构建蛋白质指纹谱库,对布鲁克数据库进行扩展。对标准菌株 ATCC 29213、ATCC 25922、ATCC 700603、ATCC 27853 进行 MALDI-TOF MS 鉴定,评价扩展库的准确性。选取 6 株百日咳鲍特菌,每个菌株取 3 个菌落分别用 MALDI-TOF MS 鉴定,评价试验的精密度。采用 36 株临床分离株验证扩展谱库对百日咳鲍特菌的识别能力,并进行扩展库前后鉴定结果比较。结果 成功构建 9 株百日咳鲍特菌和 1 株副百日咳鲍特菌参考谱库,并扩展现有布鲁克数据库 Taxonomy(5989)数据库为 Taxonomy(5989+)。扩展库准确鉴定 4 株标准菌株 ATCC 29213、ATCC 25922、ATCC 700603、ATCC 27853,对鲍特菌鉴定无干扰;6 株百日咳鲍特菌的重复鉴定符合率为 100%,精密度良好。用于外部验证的 36 株菌经扩展后数据库鉴定,种水平鉴定率达 86.1%。结论 百日咳鲍特菌质谱库的扩展提升了地区性分离菌株鉴定能力。

关键词:基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱;百日咳鲍特菌;鉴定;谱库

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

百日咳是百日咳鲍特菌(*Bordetella pertussis*, Bp)感染引起的一种严重的急性呼吸道传染病。鲍特菌家族成员还包括副百日咳鲍特菌(*Bordetella parapertussis*, Bpp)、支气管败血鲍特菌(*Bordetella bronchiseptica*, Bb)和霍氏鲍特菌(*Bordetella holmesii*, Bh)等。目前 Bp 的实验室诊断主要依靠细菌培养、鼻咽拭子 PCR 检测^[1]。传统的细菌培养后生化鉴定方法操作繁琐、耗时长。鼻咽拭子 PCR 检测灵敏度高,但容易产生假阳性。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, MALDI-TOF MS)技术通过将待测微生物的特征蛋白质指纹图谱与已知微生物的特征蛋白质指纹图谱数据库比对,实现微生物的鉴定,可弥补生化反应耗时长的缺点。Bruker 数据库包含 10 株 Bp、11 株 Bpp 和 9 株 Bb 等谱图信息,其他品牌质谱仪谱库尚未列入 Bp 谱图信息。由于菌株的地区差异较大,现有的质谱库并不能满足地方流行株的准确鉴定需求。本研究以本地区临床分离 Bp 进行质谱库的扩充以提升地方分离株的鉴定能力。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集天津市第二人民医院 2018 年 3 月至 2019 年 8 月自门诊和住院患儿(0~6 个月)鼻咽拭子或呼吸道抽吸物培养分离获得的 45 株 Bp 和 1 株 Bpp,挑取其中 10 株(9 株 Bp 和 1 株 Bpp)用于现有数据库的扩展,其余 36 株用于验证 Bruker

蛋白质指纹谱库扩展后的鉴定效果。所有菌株的最初鉴定采用 Bruker 公司的 MALDI-TOF MS 质谱技术,并经全基因组测序验证。金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、大肠埃希菌 ATCC 25922、肺炎克雷伯菌 ATCC 700603、铜绿假单胞菌 ATCC 27853 来自天津市临床检验中心。

1.2 主要试剂与仪器 炭琼脂粉(英国 Oxoid 公司),血琼脂平板(天津金章科技公司),甲酸和乙腈(国药集团化学试剂公司),QIAamp DNA Mini Kit(美国 Qiagen 公司);基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪、HCCA 基质及质谱鉴定校准品 BTS(德国 Bruker 公司),高通量基因测序仪 BGISEQ-500 及高通量测序套装 PE50(华大智造科技公司)。

1.3 菌株分离培养及鉴定 所有菌株初代培养用炭琼脂培养基,挑取单个菌落转种于血琼脂平板。菌种经 MALDI-TOF MS 初步鉴定后,用 QIAamp DNA Mini Kit 提取全基因组 DNA,应用超声波将 DNA 片段化后用于文库制备。单链环状 DNA 分子通过滚环复制,形成 1 个包含 300 多个拷贝的 DNA 纳米球。将得到的 DNA 纳米球采用高密度 DNA 纳米芯片技术,加到芯片的网状小孔内,通过联合探针锚定聚合技术进行测序^[2]。全基因组测序工作委托深圳华大基因公司完成。原始数据应用生物信息分析软件 MegaBOLT 进行数据质控,数据比对,变异识别,从而得到有效数据。测序读长 300 bp、测序深度 20 倍、覆盖度 92%。测序所得序列与 GenBank 数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中的序

列比对,获得菌株鉴定结果。

1.4 数据库扩展 挑取 1.3 中 9 株 Bp 和 1 株 Bpp,用于扩展布鲁克数据库 Taxonomy (5989)。样品的前处理采用甲酸乙腈提取法^[3],取上清液 1 μ L 点在 96 孔靶板上,室温下晾干,再加 1 μ L HCCA 覆盖,室温下晾干后上机。靶板中心点位涂布校准品 BTS,用于质谱仪器的内部校准。每个样品重复点 8 个样品孔,应用仪器 Microflex LT 软件,每个靶点采集 3 张质谱图,每个菌株采集 24 张质谱图并作为质谱文件保存。使用 Biotyper 3 软件分别调入所采集的 9 株 Bp 和 1 株 Bpp 的质谱图,根据 Bruker 主谱图(main spectral profile, MSP)创建要求,将同一菌株的 24 张质谱图(至少 20 张)汇总生成整合图谱,创建为该菌株的 MSP。应用 Biotyper 3 软件将质谱图进行数据分析汇总,将创建的 MSP 导入布鲁克数据库 Taxonomy (5989),扩展后的数据库命名为 Taxonomy (5989+)。

1.5 MALDI-TOF MS 的准确性、精密度评价 参考文献[4]方法,对 ATCC 29213、ATCC 25922、ATCC 700603、ATCC 27853 各 1 株,进行 MALDI-TOF MS 鉴定,通过获得的鉴定结果与分值评价该方法的准确性。参考文献[5]方法,选取 6 株 Bp 传代培养,

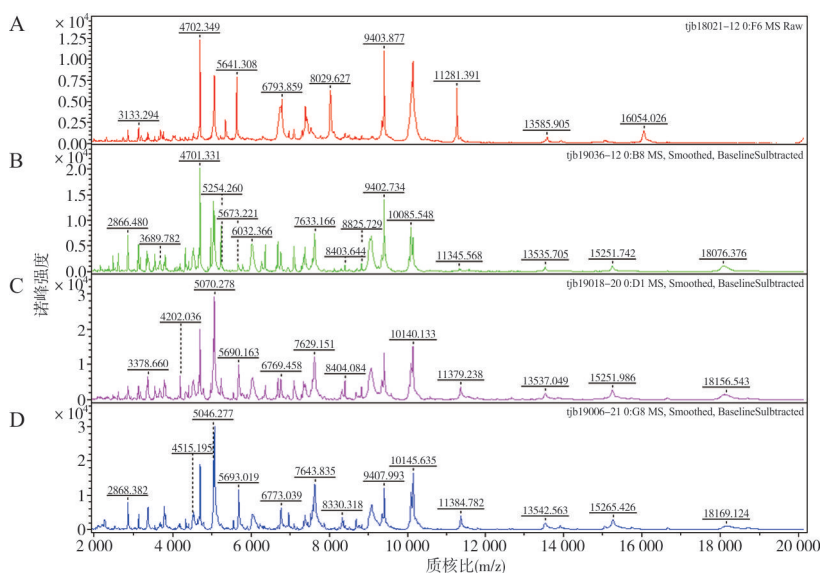
每个菌株取 3 个菌落分别制备靶板,用 MALDI-TOF MS 鉴定,以鉴定符合率评价方法的精密度。

1.6 数据库扩展前后菌株的鉴定 按照 1.4 中方法制备 36 株待测菌靶板,分别用 Taxonomy (5989) 和 Taxonomy (5989+) 进行鉴定。依据 Bruker 仪器说明书,鉴定分值判断标准如下:分值为 2.300 ~ 3.000,表示可信的种水平的鉴定;分值为 2.000 ~ 2.299,表示可信的属水平的鉴定,可能的种水平鉴定;分值为 1.700 ~ 1.999,表示可能的属水平的鉴定;分值为 0.000 ~ 1.699,表示鉴定结果不可信。

2 结果

2.1 全基因组测序结果 文库构建插入片段大小为 300~400 bp,应用 MegaBOLT 软件进行基因组的从头组装,最终获得的有效数据片段大小为 1 100~1 300 Mb。测序所得序列与美国国立生物技术中心(NCBI)库中的参考序列比对,其中 1 株鉴定为 Bpp 外,其余均鉴定为 Bp。

2.2 MALDI-TOF MS 数据库的扩展 成功构建 9 株 Bp 和 1 株 Bpp 参考谱库,并扩展现有布鲁克数据库 Taxonomy (5989) 数据库为 Taxonomy (5989+)。部分菌株 MALDI-TOF MS 质谱峰见图 1。



注:A, Bpp 编号 18021;B, Bp 编号 19036;C, Bp 编号 19018;D, Bp 编号 19006。

图 1 部分建库菌株的 MALDI-TOF MS 质谱图

2.3 MALDI-TOF MS 的准确性和精密度 用 MALDI-TOF MS 鉴定 4 株标准菌株 ATCC 29213、ATCC 25922、ATCC 700603、ATCC 27853,鉴定分值均大于 2.300,对鲍特氏菌鉴定无干扰,表明试验的准确性良好。6 株 Bp 每个菌株分别取 3 个菌落进行鉴定,重复测定 3 次,鉴定符合率为 100%,表明试

验的精密度良好。

2.4 数据库扩展对鉴定结果的影响 36 株 Bp 建库前可信度分值为 2.000~2.229 者(准确鉴定到属)有 28 株,分值为 1.7000~1.999 者 7 株,无分值>2.300 菌株;建库后可信度分值>2.300 者(准确鉴定到种)有 31 株,占 86.1% (31/36),分值为 2.000 ~ 2.229 者

(准确鉴定到属)有 4 株。

3 讨论

菌株蛋白质指纹图谱信息的丰富是准确鉴定菌株的基础,选择建库的菌株必须有代表性,要囊括尽量多的型别和不同的地区分离株,尤其要包括本地区种群的菌株,以便获得更好的匹配结果^[6]。由于不同国家或地区的菌株具有一定的差异,建立适合本地区的 Bp 蛋白质指纹图谱数据库具有重要意义。

本研究选取经全基因组测序确认的 9 株 Bp 和 1 株 Bpp 临床分离菌株为基础,建立一个与商业数据库互补的扩展数据库。结果显示,建库前本院分离菌株的鉴定结果分值普遍偏低,建库后菌株鉴定结果可信度分值>2.300 者提升到 86.1%,表明建库后种水平鉴定结果可信度显著增高。相似的结果与 Van den Bossche 等^[7]研究具有一致性。

MALDI-TOF MS 技术从根本上改变了目前临床实验室对微生物鉴定的操作模式,为微生物快速鉴定带来了一场革命。由于 Bpp、Bb 等感染非常少见,本扩展库尚存在纳入菌株种类不足等缺陷。相信随着数据库的不断补充与应用软件的改善, MALDI-TOF MS 不仅将在 Bp 的鉴定中体现快速、准确、高通量的特点,还会成为 Bp 分型和流行病学研究的有力工具。

4 参考文献

- [1]王增国,杨杨,刘莹,等.百日咳实验室诊断方法的应用分析与比较[J].中华流行病学杂志,2013,34(10):1010-1012.
- [2]Huang J, Liang X, Xuan Y, et al. A reference human genome dataset of the BGISEQ-500 sequencer [J]. Gigascience, 2017, 6(5): 1-9. [published correction appears in Gigascience, 2018, 7(12): giy144].
- [3]Lawton SJ, Weis AM, Byrne BA, et al. Comparative analysis of *Campylobacter* isolates from wild birds and chickens using MALDI-TOF MS, biochemical testing, and DNA sequencing[J]. J Vet Diagn Invest, 2018, 30(3): 354-361.
- [4]王青,王殿夫,董雪,等.基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱用于致病性弧菌鉴定[J].辽东学院学报(自然科学版),2019,26(3):153-159.
- [5]徐蓉,慎慧,黄媛媛,等.基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱微生物鉴定系统性能验证方案的建立[J].临床检验杂志,2018,36(10):783-787.
- [6]张丽荣,黄辉涛,方艳梅,等.霍乱弧菌基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术谱库的构建[J].中国卫生检验杂志,2018,28(2):172-175.
- [7]Van den Bossche D, De Bel A, De Smet D, et al. Prevalence of *Bordetella holmesii* and *Bordetella bronchiseptica* in respiratory tract samples from Belgian patients with pertussis-like symptoms by sensitive culture method and mass spectrometry[J]. Acta Clin Belg, 2013, 68(5): 341-348.

(收稿日期:2019-11-20)

(本文编辑:周万青,刘群)