

B族链球菌基质辅助激光解析电离飞行时间质谱蛋白指纹特征肽峰验证研究

陈光炼¹ 刘海英¹ 高坎坎¹ 关小珊¹ 钟华敏¹ 邓秋连¹ 湛亚星¹ 梁文怡²
蒋莹² 谢永强¹ 黄莲芬¹

【摘要】目的 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)分析验证既往发现的B族链球菌(GBS)序列分型(ST)、血清型蛋白指纹特征肽峰及D试验阳性相关肽峰,为临床GBS快速分型和有效诊疗提供依据。**方法** 选取2015年1月至2017年12月全国多中心新生儿侵袭感染分离的237株GBS,均已知血清分型及多序列分型(MLST),运用Bruker微生物质谱仪采集菌体蛋白的肽指纹图谱,纸片扩散法分析菌株对红霉素和克林霉素耐药表型及红霉素诱导克林霉素的耐药发生率,用FlexAnalysis 3.0软件分析和验证特征肽峰。**结果** 分子分型相关特征肽峰分析示,237株GBS均未见m/z 7 625肽峰,但48.3% ST17型菌株中(41/85)有m/z 7 620肽峰;所有ST1型菌株(2/2)均检出m/z 6 250肽峰且无m/z 6 888肽峰,即肽峰对(m/z 6 250+/6 888-),该峰对亦见于所有ST10菌株(31株)及ST2(2株)、ST4(1株)、ST156(1株)和ST579(1株)菌株。血清分型相关特征肽峰示,m/z 6 891在血清III型(96.4%、133/138)和I b型(81.2%、56/69)常见,但在I a(90.5%、19/21)和V型(87.5%、7/8)亦常见,故m/z 6 891肽峰无血清型特异性;m/z 7 620处小肽峰可见于29.7% III型菌株(41/138),且均为ST17型,于其他血清型中偶见,包括V型(12.5%、1/8)、I a型(9.5%、2/21)和I b(2.9%、2/69)。m/z 7620肽峰对III/ST17型GBS判断的灵敏度和特异性分别可达48.2%和93.1%。D-试验阳性耐药相关特征峰,红霉素为中介或耐药,克林霉素敏感的菌株占33.76%(80/237),其中D-试验阳性占77.5%(62/80)。主要克隆亚型D试验阳性率从高到低依次为ST10/I b(100%、9/9)和ST12/I b或ST12/III(100%、13/13)、ST17/III(90%、27/30)、ST19/III(40%、4/10)、ST23/I a(16.67%、1/6),ST10、ST12和ST17亚型D试验阳性率高达94.23%(49/52)。**结论** 肽峰对(m/z 6 250+/6 888-)为ST1、ST10及少许罕见ST型GBS菌共有特征峰,m/z 6 891为不同血清型共有肽峰,而非III/I b特异;m/z 7 620则为III/ST17型菌特征肽峰,提示其可用于高毒力GBS的快速鉴定;100% ST10、ST12和90% ST17 D-试验阳性,其ST型特征肽峰可用于预测GBS D实验阳性。

【关键词】 B族链球菌; 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱; 肽峰; D-试验

Validation of peptide peaks specific for Group B *Streptococcus* with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry Chen Guanglian¹, Liu Haiying¹, Gao Kankan¹, Guan Xiaoshan¹, Zhong Huamin¹, Deng Qiulian¹, Chen Yaxing¹, Liang Wenyi², Jiang Ying², Xie Yongqiang¹, Huang Lianfen¹.
¹Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510120, China; ²Academy of Pediatrics, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511483, China
Corresponding author: Huang Lianfen, Email: 28321491@qq.com

【Abstract】Objective Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis was applied to verify the characteristic peptide peaks of group B *Streptococcus* (GBS) protein fingerprints for sequence types (ST), serotypes and positive "D-zone test", providing evidence for rapid GBS subtyping and effective diagnosis and treatment. **Methods** Total of 237 GBS isolates were collected from multicenter neonatal invasive infections in China from January 2015 to

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2021.03.011

基金项目: 广州市科技创新委员会项目(No. 201804010447); 广州医科大学大学生科技创新项目(No. 2019AEK01); 广州市妇女儿童医疗中心院内课题(No. YIP-2019-051)

作者单位: 510120 广州市, 广州医科大学广州市妇女儿童医疗中心检验科¹; 511483 广州市, 广州医科大学儿科学院²

通信作者: 黄莲芬, Email: 283214911@qq.com

December 2017 with known STs and serotypes, whose GBS peptide fingerprints were collected by Bruker microbial mass spectrometer, and the characteristic peaks were analyzed by FlexAnalysis 3.0, also the disk diffusion method was used for analysis of erythromycin and clindamycin resistance as well as erythromycin-induced clindamycin resistance. **Results** Molecular type-correlated characteristic peptide peaks: m/z 7 625 was not found in all 237 strains of GBS, but 48.3% (41/85) strains of ST17 showed a peptide peak around m/z 7 620; all strains of ST1 (2 strains) showed presence of m/z 6 250 and absence of m/z 6 888 (m/z 6 250+/6 888-), which was also found in all strains of ST10 (31 strains), ST2 (2 strains), ST4 (1 strain), ST156 (1 strain) and ST579 (1 strain). Serotype-correlated peptide peaks: m/z 6 891 was not only present in serotype III (96.4%, 133/138) and I b (81.2%, 56/69), but also common in I a (90.5%, 19/21) and V strains (87.5%, 7/8), suggesting m/z 6 891 peptide peak had no specificity for serotypes; m/z 7 620 was detected with low intensity in 29.7% III GBS (41/138), all of which belonged to ST17 subclone, m/z 7 620 was occasionally existed in other serotypes including V (12.5%, 1/8), I a (9.5%, 2/21) and I b (2.9%, 2/69), with a sensitivity of 48.2% and specificity of 96.71% for III/ST17 GBS. Positive “D-zone test”-associated peptide peaks: 33.76% (80/237) strains were sensitive to clindamycin with resistance or intermediate-resistance to erythromycin, of which 77.5% (62/ 80) were D-test positive. D-test positive rates of the main subtype clone were ST10/I b (100%, 9/9), ST12/I b or ST12/III (100%, 13/13), ST17/III (90%, 27/30), ST19/III (40%, 4/10), ST23/I a (16.67%, 1/6) sequentially, and the D-test positive rate of ST10, ST12 and ST17 subtypes was high (94.23%, 49/52). **Conclusions** Peptide peak pairs (m/z 6 250 +/ 6 888-) was specific to STs including ST1, ST10 and a few rare ST types, while m/z 6 891 peptide peak was common in different serotypes but not specific for III/I b; m/z 7 620 was the characteristic peptide peak for III/ST17 lineage, suggesting it could be used for rapid identification of hypervirulent GBS. D test was positive in all ST10 and ST12, as well as 90% ST17 GBS strains, indicating their ST characteristic peptide peaks could be taken for prediction of positive D-test.

【Key words】 Group B *Streptococcus*; Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; Peptide peak; D-test

B族链球菌 (group B *Streptococcus*, GBS), 又称无乳链球菌, 正常定植于妇女的下生殖道与消化道, 亦是导致新生儿脓毒症和脑膜炎最常见的原因之一, 严重者可致新生儿死亡, 且相当一部分脑炎患儿恢复后会留有神经系统后遗症^[1]。怀孕期间GBS定植是新生儿感染的主要危险因素, 并伴婴儿发病和死亡的风险^[2-3]。GBS可经母婴垂直传播途径入侵新生儿血液, 引起以败血症和肺炎为主要临床表现的早发型感染 (early-onset disease, EOD), 于出生后1周内发病; 亦可通过水平传播, 引发以败血症和脑膜炎为主的晚发型感染 (late-onset disease, LOD), 于出生后7~89 d发病。基于孕晚期GBS普筛的产时抗菌药物干预是目前唯一行之有效的预防方法; 研究显示大部分GBS脑炎主要与感染某些高毒力的亚型菌株有关^[4-6]。因此, GBS及其亚型 (血清型或序列分型) 的快速鉴定对于感染的防控举足轻重。

近年来, 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 技术因其速度快、成本低、准确性高的特点在临床病原微

生物鉴定领域中得到广泛应用, 该技术不仅能在数分钟内将致病菌鉴定到属、种, 有报道亦可根据差异肽峰谱而快速对某些细菌进行耐药性分析、亚型鉴定及毒力因子检测^[7]。迄今也有一些采用MS技术对GBS亚型相关特征肽峰的研究, 如Lartigue等^[8]最先于2011年报道ST17型菌特征表达 m/z 7 625肽峰和ST1型菌的 m/z 6 250肽峰表达而缺失 m/z 6 888肽峰; 近期 m/z 6 891被发现为血清III型和 I b型菌的共有特征肽峰, 而 m/z 7 620肽峰则为III型菌所特有^[9-10]。

因GBS传统的亚型分型方法操作繁琐、分辨率低、耗时等缺点导致其在临床实验室中的常规应用受到限制。已经报道的这些特征肽峰是否能用于临床微生物质谱仪对该菌亚型的快速鉴定目前尚未明确。克林霉素是美国CDC推荐作为青霉素过敏人群的GBS治疗和预防用药。目前, 临床普遍采用药敏卡片上机法检测GBS对常用抗菌药物的最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 值, 分析其对各种药物的耐药性, 当药敏试验结果出现红霉素耐药而克林霉素中介或敏感时, MIC法不能准确预测菌株的红霉素诱导克林霉素耐药表型, 而需要加做传统的纸片扩散法, 进行红霉素诱

导的克林霉素耐药试验(D-抑菌圈试验),来分析是否存在红霉素诱导的克林霉素耐药,操作较为繁琐。截至目前尚未见报道GBS的红霉素诱导克林霉素耐药相关的MALDI-TOF质谱特征峰。本研究拟采用前期已建立的GBS菌库中已知ST分型和血清型的237株GBS临床分离菌株进行ST型和血清型特征肽峰的验证研究,并结合红霉素诱导克林霉素耐药表型,分析诱导耐药阳性和阴性组菌株MALDI-TOF质谱差异肽峰,为临床红霉素诱导耐药快速判断提供参考,现报道如下。

材料与方法

一、实验菌株

237株GBS菌株取自2015年1月至2017年12月分离收集的全国多中心新生儿侵袭感染GBS菌库。GBS菌来源于3月龄以下的低龄婴儿血液或脑脊液标本,均经血清凝集试验、分子生物学分型及多重PCR的多位点序列分型(multi-locus sequence typing, MLST)^[11]。ST分型包括ST17型85株、ST19型37株、ST12型32株、ST10型31株、ST23型11株、ST27型6株、ST188型5株、ST1、ST2、ST24、ST197、ST651各2株,其余为其他少见型各1株;血清型包括III型138株、Ib型69株、Ia型21株、V型8株和IV型1株。

二、方法

1. 菌株复苏:复苏-70℃低温保存的GBS菌株,转种至哥伦比亚血琼脂平板(迪景生物有限公司);将平板置于35℃、5%CO₂孵箱孵育16~18h,得到纯培养菌落。

2. 菌体蛋白提取:GBS菌体蛋白提取采用乙醇/甲酸提取法^[12-14]。用接种环取分纯菌落与300μl去离子水充分混匀,再加入900μl无水乙醇,充分混匀后,13 000 r/min转速离心2 min(离心半径r=8.6 cm);弃上清液后再次离心,小心吸弃残余乙醇,沉淀于室温晾干;相继加入等量70%甲酸溶液和乙腈,充分混匀,然后以13 000 r/min转速离心2 min;取1μl上清液至MALDI靶板,室温晾干后涂覆1μl基质溶液,室温晾干,30 min内上质谱仪采集谱图。

3. 菌株谱图采集:将MALDI靶板放入微生物质谱仪(MALDI Microflex LT, Bruker Daltonics, Bremen, Germany)中上机检测。每次检测同时做定标及质控,以减少指纹谱图曲线漂移。应用FlexControl 3.0采集蛋白指纹图, MALDI Biotyper

3.1对谱图进行评分。为保证蛋白指纹图谱的质量和可靠性,所有菌株均选取鉴定分值>2.3的蛋白指纹图谱进行分析。应用FlexAnalysis 3.0查阅谱图,每个菌株谱图均查看4组肽峰(m/z 7 625、6 250/6 888、6 891和7 620),并结合其血清型和ST型分布特征分析,同时按以下公式计算灵敏度和特异性:灵敏度: $Sp = TP / (TP + FN)$, 特异性: $Sn = TF / (TF + FP)$ 。

4. 诱导型克林霉素耐药试验(D-抑菌圈试验):选用纸片扩散法检测GBS菌株对红霉素和克林霉素耐药抑菌圈,按2020版CLSI M100-S30指南判断耐药表型,对红霉素耐药而对克林霉素敏感或中介的GBS菌株,需根据靠近红霉素纸片处克林霉素抑菌圈有无减少或截平判断为D-抑菌圈试验是否阳性。D-抑菌圈试验阳性组为诱导耐药表型(inducible MLSB, iMLSB),而靠近红霉素处克林霉素抑菌圈无减少的为D试验阴性组,即M型,为主动外排所致耐药。应用FlexAnalysis 3.0分析谱图,分析D试验阳性组和阴性组GBS菌株肽峰差异,并分析D试验阳性和阴性组血清型和ST型分布特征,为寻找D实验阳性特征肽峰提供参考。

结 果

一、不同分子分型的特征肽峰

1. ST17型m/z 7 625肽峰:所有237株GBS株验证菌,包含85株ST17型GBS菌在内,均未发现m/z 7 625处肽峰表达。但48.3% ST17型GBS(41/85)在m/z 7 620处有肽峰(图1),均为血清型III型菌株。另外,少数(3.5%, 3/85) III/ST17型GBS在m/z 7 625~7 640范围内有肽峰。

2. ST1型m/z 6 250肽峰表达与m/z 6 888缺失:本研究中2株ST1型菌株均可见m/z 6 250肽峰且未见m/z 6 888肽峰(图2a);该肽峰对表达特征(m/z 6 250+6 888-)亦见于所有ST10菌株(31/31)及罕见ST型,包括ST2(2/2)、ST4(1/1)、ST156(1/1)、ST579(1/1)。其他常见ST型(ST12、ST17、ST19、ST23)菌株均未出现m/z 6 250肽峰,但有m/z 6 888峰。因此,m/z 6 250峰表达与m/z 6 888峰缺失并非ST1所特有,而是ST1、ST10型和罕见型(ST2、ST4、ST156和ST579)共有。

二、不同血清分型的特征肽峰

1. Ib型与III型m/z 6 891肽峰:GBS菌株的

96.4%血清III型(133/138)和81.2% I b型菌(56/69)可见 m/z 6 891肽峰,但亦常见于大多数 I a型菌(90.5%、19/21)、V型菌株(7/8)和1株IV菌(图3)。因此, m/z 6 891肽峰并非III/ I b型特征峰,而很可能为GBS各血清亚型所共有的蛋白肽峰。

2. III型 m/z 7 620肽峰: GBS菌株的29.7% III型菌(41/138,图4)可见 m/z 7 620处低丰度小肽峰,这41株菌均为ST17型。其他血清型菌株包括V型(12.5%、1/8)、I a型(9.5%、2/21)和

I b(2.9%、2/69)偶见该肽峰,其序列分型分别为V型(ST163)、I a型(ST4、ST23)、I b型(ST10、ST12)。因此, m/z 7 620肽峰相对于III型/ST17型GBS的灵敏度和特异性分别为48.2%(41/85)和96.71%(147/152)。

三、红霉素诱导克林霉素耐药及差异肽峰

新生儿GBS侵袭感染菌株中,纸片扩散法检测出红霉素为中介或耐药,克林霉素为敏感的菌株占33.76%(80/237),其中D-试验阳性株占26.16%

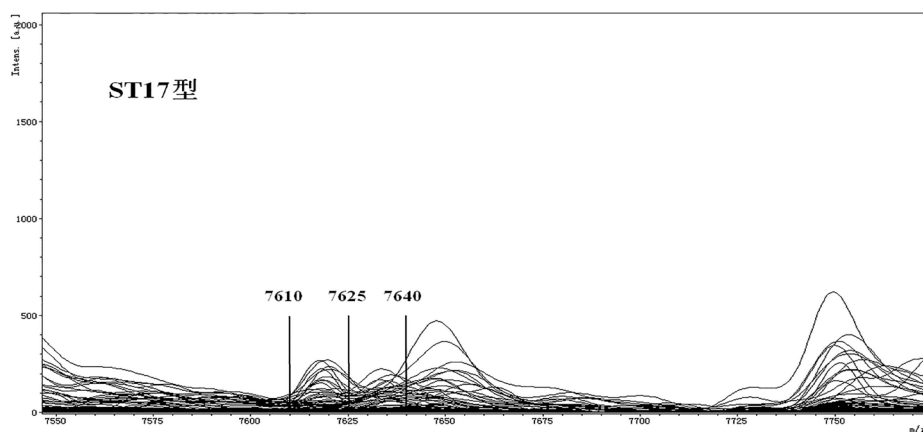
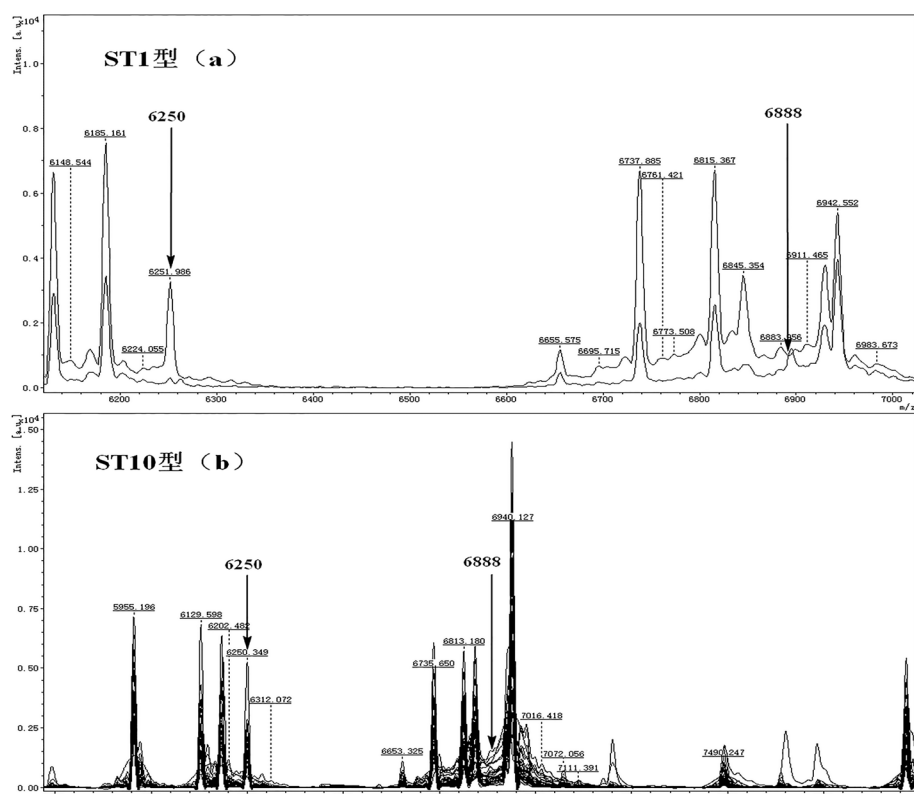


图1 ST17型GBS菌 m/z 7 625肽峰表达指纹图



注: a: ST1型, b: ST10型

图2 ST1型和ST10型GBS菌 m/z 6 250与6 888肽峰图

(62/237), D实验阴性株占7.59% (18/237)。由于D实验阴性株菌株数量有限, 未能找到D实验阳性株和阴性株的差异特征肽峰。但62株D实验阳性菌株主要克隆亚型为ST17/III (43.55%、27/62), ST12/ I b (19.35%、12/62), ST10/ I b (14.52%、9/62) 和ST19/III (6.45%、4/62)。18株D实验阴性菌株主要亚型为ST19/III (33.33%、6/18), ST23/ I a (27.78%、5/18) 和ST17/III (16.67%、3/18)。GBS主要克隆亚型按D试验阳性率排序依次为ST10/ I b (100%、9/9) 和ST12/ I b (12株) 或III (1株) (100%、13/13), ST17/III (90%、27/30), ST19/III (40%、4/10), ST23/ I a (16.67%、1/6)。因此, 100% ST10和ST12, 90% ST17 D-试验阳性, 其ST型特征肽峰可用于预测GBS菌株D实验阳性。

讨 论

GBS荚膜多糖抗原是重要的毒力因子, 根据荚膜多糖抗原不同, 分为 I a、I b、II~IX 10种血清型, 不同血清型均可在患者孕晚期检出^[15]。血清型 III、I a、I b可引起新生儿肺炎、败血症、脑膜炎等重症感染, 70%脑膜炎患儿由III型血清型GBS感染引起^[1, 6]。另外, 根据GBS七个管家基因的核苷酸可进行多位点序列分型, ST分型种类繁多, 但新生儿侵袭感染以ST17、ST19和ST23等常见^[11, 16]。病原菌MALDI-TOF MS种属鉴定常基于不同种属微生物的保守蛋白峰, 而对同种菌不同亚型如抗菌药物耐药亚型的快速分型则依赖特定蛋白峰^[17-18]。已有报道认为, GBS菌株质谱图差异与GBS亚型关联, 其中血清型III (主要包括高毒力的ST17和多药耐

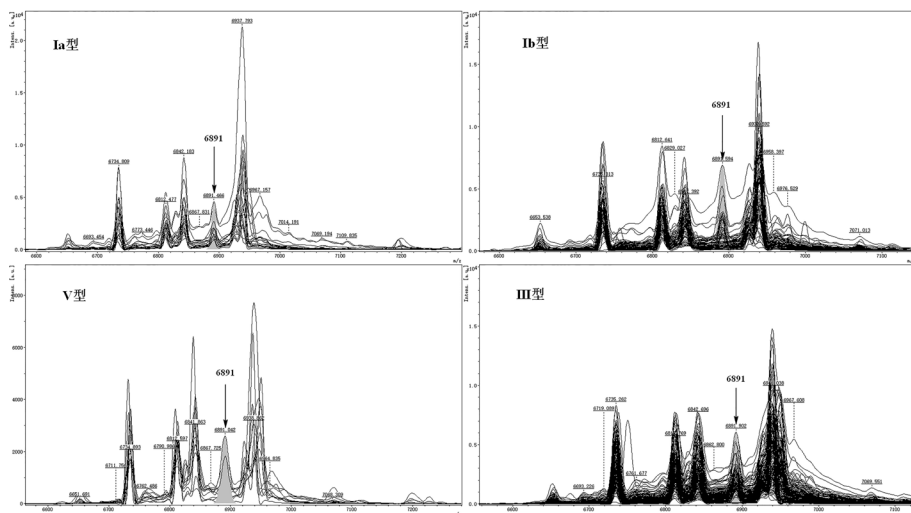


图3 I a型、I b型、III型和V型菌株m/z 6891肽峰图

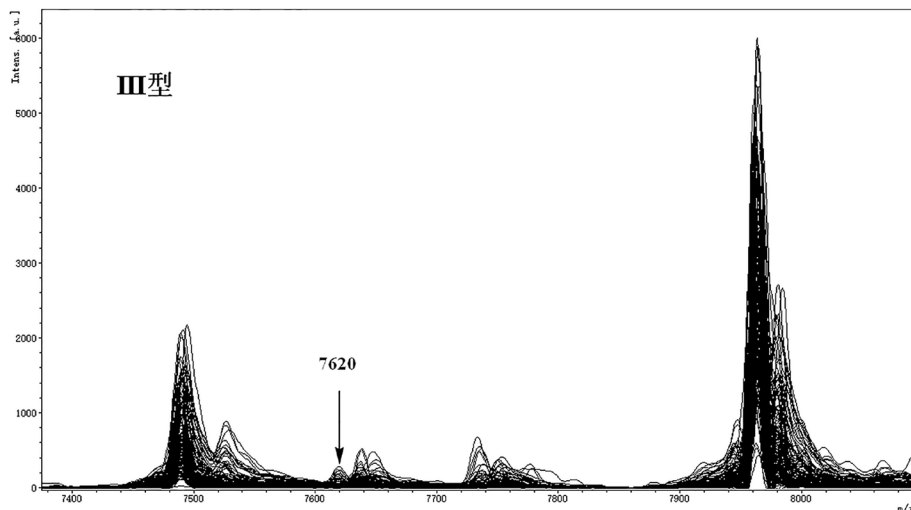


图4 血清III型GBS菌m/z 7620处肽峰图

药的ST19)和ST23型GBS的质谱蛋白指纹图谱峰与其他亚型差异显著,可能与这两大类亚型菌株与其他血清型或ST亚型GBS菌基因水平存在显著差异有关^[13]。MALDI-TOF MS是对GBS鉴定及分型的一种有效方法^[19]。

GBS分子分型相关的质谱特征肽峰有ST1型菌的m/z 6 250表达及伴随的m/z 6 888肽峰缺失,以及ST17型菌的m/z 7 625肽峰缺失^[8]。我国新生儿侵袭性临床株罕见ST1亚型,本菌库仅有2株ST1,均检出ST1特征肽峰m/z 6 250及m/z 6 888缺失(m/z 6 250+/6 888-)。该肽峰对亦可在所有ST10(31株)和部分罕见ST亚型即ST2、ST4、ST156和ST579肽指纹图中出现。另外,该肽峰对在其他常见ST亚型即ST12、ST17、ST19和ST23中表达则相反,即m/z 6 250肽峰缺失与m/z 6 888峰表达(m/z 6 250-/6 888+)。因此,m/z 6 250肽峰表达与m/z 6 888峰缺失并非ST1亚型特有,而是ST1与ST10及罕见亚型(ST2、ST4、ST156、ST579)所共有。m/z 6 250肽峰为细菌应急反应家族蛋白CsbD成员,可能是一种细胞壁水解酶,同时具有溶菌酶和可溶裂解转糖苷酶等双重活性,与GBS菌的侵袭毒力密切相关^[9]。这些亚型肽峰特征类似,提示ST1、ST2和ST10等亚型相似^[8]。ST17型GBS是新生儿晚发型GBS感染最常见的序列亚型,而m/z 7 625肽峰为ST17型GBS特征肽峰^[8]。本研究48.3%(41/85)ST17型GBS在m/z 7 610~7 625(m/z 7 625±10 Da)范围内出现肽峰。

GBS血清型相关的质谱特征肽峰有血清型I b和III型的特征肽峰m/z 6 891^[10]。本研究中血清型I a、I b、III、IV和V型GBS,m/z 6 891肽峰检出率为81.2%~100%,提示该肽峰在新生儿感染的不同血清型GBS中均常见,并不局限于I b型和III型。以往报道的MALDI-TOF MS分型案例多为单中心研究,可成功区分少数型别的菌株,却往往经不起更多型别菌株的验证^[20-21],而本研究菌株为多中心研究来源,可避免此缺陷。闫津津等^[23]发现GBS质谱峰与血清型(I、III、V型)关联密切,但未能确定具体谱峰。最近研究报道,m/z 7 620为血清型III菌特征肽峰,且为其中ST17亚型特有,并被鉴定为脱氧核糖核酸外切酶VII的1个小亚单位^[22]。与此类似,本研究菌库血清型III型GBS菌株主要ST型为ST17和ST19,其中29.71%(41/138)可检出m/z 7 620处肽峰,这些菌株的ST亚型均为ST17

型。因此,本研究支持m/z 7 620并非III型GBS的特征峰,而是III/ST17型GBS的特征峰。

GBS耐药相关的MALDI-TOF质谱特征峰,已报道的有金黄色葡萄球菌MRSA的快速分型相关肽峰^[24]。克林霉素是青霉素过敏人群GBS感染预防 and 治疗的替代药物。我国GBS分离株对红霉素和克林霉素耐药率居高不下,需结合药敏试验结果制定治疗方案,以免治疗失败。本研究显示,约1/3新生儿GBS侵袭感染分离株对红霉素耐药而对克林霉素敏感。这些菌株中,约3/4菌株(77.5%、62/80)呈现红霉素诱导克林霉素耐药,即D试验阳性。因纳入菌库中D试验阴性菌株数量少,仅为18株,难以通过统计分析比较D试验阳性和阴性株质谱图而得到可信的差异肽峰,但不同克隆亚型GBS菌株的D试验结果不同。所有ST10/I b和ST12/I b、90% ST17/III亚型菌株D试验均阳性,而ST23/I a和ST19/III亚型菌株的D试验阴性率较高,分别为83.33%(5/6)和60%(6/10),提示ST10/I b,ST12/I b和ST17/III克隆亚型的D试验阳性率高。因此,可结合菌株的ST分型,或直接查看ST型关联的特征峰,如ST10型的m/z 6 250和ST17的m/z 7 620特征峰,以及建立质谱ST分型如ST12、ST19和ST23亚型的特征峰谱分型模型进行ST快速分型,或结合血清分型辅助临床快速预测GBS菌株D试验结果。

目前关于GBS毒力相关的质谱特征肽峰报道较少。已报道的有新生儿高致病ST亚型即ST17菌株的特征肽峰m/z 7 620/7 625^[8]。本课题组亦报道了新生儿高致病型亚型ST17的高区分力肽峰m/z 2 956和m/z 5 912^[25],其在CC23和其他CC17菌株亦存在。本研究GBS蛋白肽指纹谱特征与已有基因组研究报道相符,即具有不同侵袭潜能的GBS CCs种群具有不同的毒力和生态学适应基因组特征,如侵袭性较强的CC17和CC23谱系特异的编码菌毛、群体感应蛋白和摄取离子和微量营养素蛋白的基因,与毒力、疾病、新陈代谢和细胞机制的调节有关^[26]。随着质谱技术和临床研究的不断深入,挖掘更多的GBS毒力相关肽峰是未来研究的方向。

综上,本研究通过验证不同分子亚型和血清学亚型GBS菌株质谱图特征峰,发现m/z 6 250肽峰表达与m/z 6 888峰缺失并非ST1亚型特有,亦见于ST10型和部分罕见ST亚型;肽峰m/z 6 891并非血清型III/I b特异,故不具血清型特异性;m/z

7 620可能为III/ST17亚型特征肽峰; ST10、ST12和ST17的特征峰可能是新生儿GBS侵袭性感染分离株D试验阳性的特征肽峰, 这有待于大样本数据进一步验证。以上研究结果提示, MALDI-TOF MS可用于高毒力GBS菌亚型如血清型III、ST17和ST23亚型的快速鉴定, 有望用于GBS菌株耐药表型的快速分型。

MALDI-TOF MS分型技术具有检测周期短、价格低, 对操作人员的要求不高等特点, 随着MALDI-TOF MS分型技术的不断发展和完善, 该技术将成为微生物病原学亚型鉴定的主流手段。但该技术也有局限性, 即因不同研究团队采用的细菌培养条件、蛋白样品提取方法、仪器参数设置不同, 导致所得出的实验结果差异, 难以重复^[12]。同时, MALDI-TOF MS的准确鉴定依赖于完善的数据库, 菌株数据库数量以及亚型的覆盖范围也极大限制了质谱分型技术的准确性。因此, 要不断更新和丰富菌种数据库信息, 以提高菌株分型结果的准确性。

参 考 文 献

- [1] Madrid L, Seale AC, Kohli-Lynch M, et al. Infant group B streptococcal disease incidence and serotypes worldwide: systematic review and meta-analyses[J]. Clin Infect Dis, 2017, 65(Suppl 2): S160-S172.
- [2] Verani JR, McGee L, Lesley McGee PhD, Schrag SJ, et al. Prevention of perinatal group B streptococcal disease-revised guidelines from CDC, 2010[J]. MMWR Recomm Rep, 2010, 59(RR-10): 1-36.
- [3] Mithal LB, Shah N, Romanova A, et al. Antenatal screening for group B *Streptococcus* in the setting of preterm premature rupture of membranes: empiric versus culture-based prophylaxis[J]. Perinatol Rep, 2020, 10:e26-e31.
- [4] American College of Obstetricians and Gynecologists. Prevention of group B streptococcal early-onset disease in newborns: ACOG Committee Opinion, Number 797[J]. Obstet Gynecol, 2020, 135(2): 51-72.
- [5] Romain AS, Cohen R, Plainvert C, et al. Clinical and laboratory features of group B *Streptococcus* meningitis in infants and newborns: study of 848 cases in France from 2001-2014[J]. Clin Infect Dis, 2018, 66(6): 857-864.
- [6] Tazi A, Disson O, Bellais S, et al. The surface protein HvgA mediates group B *Streptococcus* hypervirulence and meningeal tropism in neonates[J]. J Exp Med, 2010, 207(11): 2313-2322.
- [7] 李茹鑫, 杨靖, 赵建宏. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱在细菌分型中的应用进展[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(11): 890-893.
- [8] Lartigue MF, Kostrzewa M, Salloum M, et al. Rapid detection of "highly virulent" group B *Streptococcus* ST-17 and emerging ST-1 clones by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. J Microbiol Methods, 2011, 86(2): 262-265.
- [9] Lin HC, Lu JJ, Lin LC, et al. Identification of a proteomic biomarker associated with invasive ST1, serotype VI group B *Streptococcus* by MALDI-TOF MS[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2019, 52(1): 81-89.
- [10] Wang HY, Li WC, Huang KY, et al. Rapid classification of group B *Streptococcus* serotypes based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and machine learning techniques[J]. BMC Bioinformatics, 2019, 20(Suppl 19): 703.
- [11] Ji W, Liu H, Madhi SA, et al. Clinical and molecular epidemiology of invasive group B *Streptococcus* disease among infants, China[J]. Emerging Infect Dis, 2019, 25(11): 2021-2030.
- [12] 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.
- [13] Lartigue MF, Hery-Arnaud G, Haguenoer E, et al. Identification of *Streptococcus agalactiae* isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Clin Microbiol, 2009, 47(7): 2284-2287.
- [14] 曹超凡, 宋召, 周凤丽, 等. 两种菌体前处理方法对MALDI-TOF MS鉴定临床分离菌效果的影响[J/CD]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2018, 6(1): 27-31.
- [15] Korir ML, Manning SD, Davies HD. Intrinsic maturational neonatal immune deficiencies and susceptibility to group B *Streptococcus* infection[J]. Clin Microbiol Rev, 2017, 30(4): 973-989.
- [16] Kang HM, Lee HJ, Lee H, et al. Genotype characterization of group B *Streptococcus* isolated from infants with invasive diseases in South Korea[J]. Pediatr Infect Dis J, 2017, 36(10): 242-247.
- [17] Goldstein JE, Zhang L, Borror CM, et al. Culture conditions and sample preparation methods affect spectrum quality and reproducibility during profiling of *Staphylococcus aureus* with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Lett Appl Microbiol, 2013, 57(2): 144-150.
- [18] 王凯谨, 朱学彤, 许建成. MALDI-TOF MS在细菌耐药性检测中的应用进展[J]. 临床检验杂志, 2019, 37(10): 760-763.
- [19] Ábrók M, Tigyi P, Kostrzewa M, et al. Evaluation of the results of group B *Streptococcus* screening by MALDI-TOF MS among pregnant women in a Hungarian hospital[J]. Pathogens, 2019, 9(1): 1-7.
- [20] Valentine N, Wunschel S, Wunschel D, et al. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(1): 58-64.
- [21] Penny C, Grothendick B, Zhang L, et al. A designed experiment approach to optimizing MALDI-TOF MS spectrum processing parameters enhances detection of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni*[J]. Front Microbiol, 2016, 5(7): 818.
- [22] Lanotte P, Perivier M, Haguenoer E, et al. Proteomic biomarkers associated with *Streptococcus agalactiae* invasive genogroups[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54393.
- [23] 闫津津, 石慧春. 质谱分析仅用于无乳链球菌血清型分型的初步探究[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(11): 2631-2633.
- [24] Hsin-Yao Wang, Frank Lien, Tsui-Ping Liu, et al. Application of a MALDI-TOF analysis platform (ClinProTools) for rapid and preliminary report of MRSA sequence types in Taiwan[J]. Peer J, 2018, 6: e5784.
- [25] 李姿娴, 刘海英, 高坎坎, 等. ST17型B组链球菌MALDI-TOF MS快速鉴定模型的建立[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(10): 996-1001.
- [26] Gori A, Harrison OB, Mlia E, et al. Pan-GWAS of *Streptococcus agalactiae* highlights lineage-specific genes associated with virulence and niche adaptation[J]. MBIO, 2020, 11(3): e00728-20.

(收稿日期: 2020-05-10)

(本文编辑: 孙荣华)

陈光炼, 刘海英, 高坎坎, 等. B族链球菌基质辅助激光解析电离飞行时间质谱蛋白指纹特征肽峰验证研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2021, 15(3): 209-215.