

研究报告

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱与 VITEK 和 *rpoB* 基因测序三种方法对食品中葡萄球菌鉴定效果的比较赵晓娟¹,汪琦¹,王紫薇¹,魏海燕¹,马丹¹,李丹¹,魏咏新¹,张西萌¹,付溥博¹,陈颖²,曾静¹

(1. 中国海关科学技术研究中心,北京 100026; 2. 中国检验检疫科学研究院,北京 100176)

摘要:目的 比较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)、*rpoB* 基因测序和 VITEK 2 Compact 三种方法对葡萄球菌的鉴定效果。方法 同时采用三种方法对实验室保存的从食品中分离的 59 株葡萄球菌进行鉴定。结果 MALDI-TOF MS 法和 *rpoB* 基因测序法一致性达 100.00%,与 VITEK 2 Compact 法的一致性为 83.05%(49/59)。7 株菌因超出 VITEK 2 Compact 鉴定范围而鉴定错误。MALDI-TOF MS 法可快速将 59 株菌准确鉴定为 17 种葡萄球菌,鉴定分值与细菌种类相关。金黄色葡萄球菌的鉴定分值最高(>2.300),松鼠葡萄球菌、鱼发酵葡萄球菌和琥珀葡萄球菌的鉴定分值相对较低(1.700~2.000)。结论 相比 *rpoB* 基因测序法和 VITEK 2 Compact 法, MALDI-TOF MS 法更加快速准确。为达到更好的鉴定效果,现有数据库仍需进一步优化。

关键词:葡萄球菌;基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱;*rpoB* 基因测序

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)01-0008-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.01.002

Comparison of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, VITEK and *rpoB* gene sequencing three methods for identification of *Staphylococci* in food

ZHAO Xiaojuan¹, WANG Qi¹, WANG Ziwei¹, WEI Haiyan¹, MA Dan¹, LI Dan¹, WEI Yongxin¹, ZHANG Ximeng¹, FU Pubo¹, CHEN Ying², ZENG Jing¹

(1. Science and Technology Research Center of China Customs, Beijing 100026, China; 2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)

Abstract: Objective To compare the identification effect of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *rpoB* gene sequencing and VITEK 2 Compact on *Staphylococci*. **Methods** Three methods were used to identify 59 isolates of *Staphylococci* from food simultaneously. **Results** The result consistency of MALDI-TOF MS and *rpoB* gene sequencing was 100.00%, while the consistency of MALDI-TOF MS with VITEK 2 Compact was 83.05% (49/59). Seven isolates were misidentified by VITEK 2 Compact because of out of identification range. The MALDI-TOF MS method could quickly identify 59 strains as 17 species of *Staphylococci*, and the identification score was related to the species. The identification score of *Staphylococcus aureus* is the highest (>2.300), and the identification score of *Staphylococcus squirrel*, *S. piscifermentans* and *S. succinus* was relatively low (1.700-2.000). **Conclusion** Compared with *rpoB* gene sequencing and VITEK 2 Compact method, MALDI-TOF MS method is more rapid and accurate. In order to achieve a better identification effect, the existing database still needs to be further optimized.

Key words: *Staphylococcus*; matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; *rpoB* gene sequencing

葡萄球菌属(*Staphylococci*)细菌广泛分布于自

然界中,是人体皮肤、黏膜的常见细菌,因而很容易污染食品。其中,金黄色葡萄球菌是重要的食源性致病菌,可通过产生肠毒素引起食物中毒^[1]。根据 GB 29921—2013《食品安全国家标准 食品中致病菌限量》^[2]标准,肉制品、水产制品、粮食制品、饮料、即食果蔬制品等食品中的金黄色葡萄球菌检测采用定量检测方法,从 Baird-Parker(BP)平板上计数

收稿日期:2020-11-04

基金项目:“十三五”国家重点研发计划(2016YFD0401102)

作者简介:赵晓娟 女 高级工程师 研究方向为食品安全与微生物检测 E-mail:zhaoxj@bjciq.gov.cn

通信作者:曾静 女 研究员 研究方向为食品安全与微生物检测 E-mail:zengj@bjciq.gov.cn

典型菌落。但在 BP 平板上,除金黄色葡萄球菌,其他葡萄球菌如人葡萄球菌、沃氏葡萄球菌、猪葡萄球菌和松鼠葡萄球菌等的菌落形态与金黄色葡萄球菌典型菌落相似,给典型菌落的挑选带来难度^[3-5]。而当实验人员挑取典型菌落不正确或未对典型菌落进行分类鉴定时,检测结果将存在较大差异。为保证检测结果的准确可靠,需建立一种快速准确鉴定食品中葡萄球菌属的方法。

相比传统生化鉴定试验,微生物全自动鉴定系统尽管能快速实现大部分细菌的种属鉴定,但细菌表型特征的不稳定性及参比数据库菌种数量、来源的局限性,严重影响细菌最终鉴定结果的准确性^[6]。

16S rRNA 基因是细菌最保守的基因之一,对其序列的分析常用来鉴定细菌的同源性,是目前细菌分类的金标准,但研究^[7]表明 16S rRNA 核酸序列在葡萄球菌属内高度保守,对亲缘关系较近的种区分能力较差。此外,文献^[8]中报道 *rpoB* 基因序列可应用于葡萄球菌种水平的鉴定。

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)是新发展起来的微生物鉴定方法,已广泛应用于临床微生物的鉴定。已有研究^[9-10]将 MALDI-TOF MS 方法应用于葡萄球菌属的鉴定,但多为临床分离菌株,对食品中葡萄球菌属的研究较少。本研究应用 MALDI-TOF MS 方法鉴定从食品中分离的葡萄球菌,从而评估 MALDI-TOF MS 方法快速准确鉴定食品中葡萄球菌的准确性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

59 株葡萄球菌属收集自 2016—2018 年送检食品样品,通过 MALDI-TOF MS 仪进行筛选分离得到。59 株分离菌株包括金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、木糖葡萄球菌(*S. xylosus*)、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)等 17 种葡萄球菌,保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

1.1.2 主要仪器与试剂

Microflex LT MALDI-TOF MS 仪(德国 Bruker)、VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统(法国生物梅里埃)、聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 Applied Biosystems)、Centrifuge 5424 型台式离心机、Friocell 222 L 培养箱(德国 MMM)。

血平板(美国赛默飞世尔)、 α -氰基-4-羟基肉桂

酸(α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid, CHCA)、溶菌酶均购自美国 Sigma,细菌检测标准品(bacterial test standard, BTS, 德国 Bruker),甲酸,乙腈,三氟乙酸,无水乙醇,GP 卡(法国生物梅里埃),PCR 引物由上海生工生物有限公司合成,*rTaq* 酶(日本 Takara),细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型,北京天根公司),溶葡萄球菌酶(上海生工生物有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌株的活化

将保存的菌株划线接种于血平板, $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h。挑取单克隆,再次划线接种血平板, $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h。

1.2.2 MALDI-TOF MS 鉴定

取少量血平板上的培养物,均匀涂抹在靶板上,每个菌株点两个点,同时点 $1\text{ }\mu\text{L}$ BTS 溶液用于仪器的校正。室温干燥后每个样点覆盖 $1\text{ }\mu\text{L}$ CHCA 基质溶液,干燥后上机鉴定。鉴定前用 BTS 样点校准仪器并用金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC 25923)和大肠埃希菌标准菌株(ATCC 15597)为阳性和阴性对照。采集蛋白分子量范围设为 2 000~20 000 Da。用 Biotyper RTC 软件进行菌株图谱信息的采集和自动鉴定。

布鲁克 MALDI-TOF MS 系统的鉴定报告以鉴定结果和鉴定分值的形式体现。鉴定分值的判定标准为:2.300~3.000 为可信的种水平鉴定;2.000~2.299 为可信的属水平鉴定,可能的种水平鉴定;1.700~1.999 为可能的属水平鉴定;0.000~1.699 为不可信的鉴定结果。

1.2.3 VITEK 2 Compact 鉴定

使用 GP 卡对细菌培养物进行鉴定。用半量生理盐水调整菌液浓度至 0.6~0.8 麦氏单位,抽真空后上机鉴定。

1.2.4 *rpoB* 基因序列测定和比对

基因组 DNA 提取:从血平板上取适量的新鲜细菌培养物,重悬于 $190\text{ }\mu\text{L}$ TE 缓冲液中。加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ 溶葡萄球菌酶(10 mg/mL)和 $5\text{ }\mu\text{L}$ 溶菌酶(10 mg/mL), $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 以上。后续步骤按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

rpoB 基因扩增和序列比对:*rpoB* 基因扩增的 PCR 反应体系为: $10\times$ buffer(含 1.5 mmol/L MgCl_2) $5\text{ }\mu\text{L}$, dNTP (2.5 mmol/L each) $4\text{ }\mu\text{L}$, *rTaq* 酶($5\text{ U}/\mu\text{L}$) $0.2\text{ }\mu\text{L}$, 引物($10\text{ pmol}/\mu\text{L}$)各 $2\text{ }\mu\text{L}$, DNA 模板 $1\text{ }\mu\text{L}$, 去离子水补充至 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。*rpoB* 基因扩增引物序列为 1418F(5'-CAATTCATGGACCAAGC-3')和 3554R(5'-CCGTCCCAAGTCATGAAAC-3')。对

于用这对引物得不到扩增产物的菌株,改用引物 2491F (5'-AACCAATTCCGTANTGGTTT-3') 和 3241R (5'-GCNACNTGNTCCATACCTGT-3') 进行扩增^[8]。扩增反应条件为 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 45 s, 52 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。经 1% 琼脂糖凝胶电泳确定特异条带后,送生工生物工程(上海)有限公司双向测序。对于 1418F 和 3554R 引物对的扩增产物,测序下游引物使用 1975R (5'-GCIACITGITCCATACCTGT-3')。对于 2491F 和 3241R 引物对的扩增产物,测序引物和扩增产物相同。使用 BioEdit 软件(版本 7.2.6.1)对正反向测序结果进行核对和拼接。利用 Blast 程序 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 将测序结果与 NCBI 数据库中的序列进行比对。

2 结果与分析

2.1 MALDI-TOF MS 鉴定结果

59 株菌经 MALDI-TOF MS 鉴定为 17 种葡萄球菌,鉴定结果见表 1。能全部达到种水平鉴定的只有金黄色葡萄球菌,鉴定分值均在 2.300 之上。鉴定分值在 2.000 以上,达到属水平鉴定的有腐生葡萄球菌(*S. saprophyticus*)、人葡萄球菌(*S. hominis*)、马胃葡萄球菌(*S. equorum*)、巴氏葡萄球菌(*S. pasteurii*)、头状葡萄球菌(*S. capitis*)、溶血性葡萄球菌(*S. haemolyticus*)、佩氏葡萄球菌(*S. pettenkoferi*)和猴葡萄球菌(*S. simiae*)。85.7% (6/7) 沃氏葡萄球菌(*S. warneri*)的鉴定分值能达到属水平鉴定,只有 1 株菌为可能的属水平鉴定。松鼠葡萄球菌(*S. sciuri*)、鱼发酵葡萄球菌(*S. piscifermentans*)和琥珀葡萄球菌(*S. succinus*)的鉴定分值相对较低,大部分介于 1.700~2.000 之间,为可能的属水平鉴定。

17 种葡萄球菌的 MALDI-TOF MS 图谱见图 1。从图谱可以看出,这 17 种葡萄球菌的 MALDI-TOF MS 图谱差异明显,易于区分。

2.2 *rpoB* 基因序列比对结果

用引物 1418F 和 3554R 对提取的 59 株葡萄球菌的 DNA 进行扩增,46 株菌扩增出特异目的片段,13 株菌未扩增出目的片段,参考 MALDI-TOF MS 的鉴定结果,这 13 株菌分别是沃氏葡萄球菌(*S. warneri*)6 株,木糖葡萄球菌(*S. xylosus*)2 株,肉葡萄球菌(*S. carnosus*)2 株,鱼发酵葡萄球菌(*S. piscifermentans*)2 株和头状葡萄球菌(*S. capitis*)1 株。改用 2491F 和 3241R 引物对这 13 株菌重新进行扩增,均扩增出目的片段。扩增产物经测序后的

序列比对结果见表 1。59 株菌的鉴定结果与 MALDI-TOF MS 的鉴定结果完全一致。

2.3 VITEK 2 Compact 鉴定结果

VITEK 2 Compact 对 59 株菌的鉴定结果见表 1。有 10 株菌的鉴定结果与其他两种方法的鉴定结果不同。具体为 2 株科氏葡萄球菌(*S. cohnii*)中有 1 株被鉴定为克氏葡萄球菌(*S. kloosii*),1 株因生化反应分辨率低而分不清是科氏葡萄球菌还是人葡萄球菌(*S. hominis*);2 株肉葡萄球菌(*S. carnosus*)中有 1 株被鉴定为科氏葡萄球菌(*S. cohnii*);2 株巴氏葡萄球菌(*S. pasteurii*)均被鉴定为沃氏葡萄球菌(*S. warneri*),2 株鱼发酵葡萄球菌(*S. piscifermentans*)均被鉴定为模仿葡萄球菌(*S. simulans*),1 株佩氏葡萄球菌(*S. pettenkoferi*)被鉴定为耳葡萄球菌(*S. auricularis*),1 株猴葡萄球菌(*S. simiae*)被鉴定为产色葡萄球菌(*S. chromogenes*)或路邓葡萄球菌(*S. lugdunensis*),1 株琥珀葡萄球菌(*S. succinus*)被鉴定为鸡葡萄球菌(*S. gallinarum*)。

3 讨论

葡萄球菌在自然界广泛存在,其中金黄色葡萄球菌是造成人类食物中毒的常见致病菌之一,在食品检测领域具有重要的检测意义。此外,多种葡萄球菌与临床感染有关。因此探索准确性高、快速的检测方法是十分必要的^[11]。基于生化分析和表型测定的手动和自动鉴定方法既耗时、成本高,又缺乏足够的区分能力^[12]。如血浆凝固酶试验可将金黄色葡萄球菌与其他葡萄球菌区分开,但是所需时间较长(2~6 h),且有时受到试剂质量和细菌状态的影响,血浆有可能呈半凝固状态,为结果判断带来困扰。同样,*rpoB* 基因测序能更有效地区分各种葡萄球菌属,但这种方法仍然耗时且成本高^[10]。而 MALDI-TOF MS 是新发展起来的微生物检测方法,已成功运用于多种细菌和真菌的鉴定,成为一种快速、可靠的微生物鉴定方法^[13-15]。在本研究中,对 MALDI-TOF MS 和 VITEK 2 Compact 鉴定结果不一致的 10 株菌分析表明, MALDI-TOF MS 的 Biotyper 鉴定系统鉴定效果优于 VITEK 2 Compact 系统主要原因是使用的从食品中分离的 59 株菌中有 7 株菌超出了 GP 卡的鉴定范围。除去超出鉴定范围的 7 株菌,本研究中 GP 卡的鉴定准确率为 94.2% (49/52),与之前文献报导的 93.2% 的鉴定准确率相当^[16-17]。对于重要的食源性致病菌金黄色葡萄球菌, VITEK 2 Compact 和 MALDI-TOF MS 的鉴定效果相当。对于其他葡萄球菌,超出 GP 卡鉴定范围的某些菌株可能很难及时发现,因为这些菌有可

表 1 MALDI-TOF MS、VITEK 2 Compact 及 *rpoB* 基因测序结果比对 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 MALDI-TOF MS, VITEK 2 Compact and *rpoB* gene sequence analyses

MALDI-TOF MS		<i>rpoB</i> 序列比对结果 (匹配度/%)	VITEK 2 Compact (匹配度/%)
鉴定结果	鉴定分值		
金黄色葡萄球菌	2.364±0.048	金黄色葡萄球菌(100.00)	金黄色葡萄球菌(95.00)
金黄色葡萄球菌	2.554±0.021	金黄色葡萄球菌(100.00)	金黄色葡萄球菌(99.00)
金黄色葡萄球菌	2.461±0.010	金黄色葡萄球菌(100.00)	金黄色葡萄球菌(99.00)
金黄色葡萄球菌	2.507±0.007	金黄色葡萄球菌(100.00)	金黄色葡萄球菌(95.00)
金黄色葡萄球菌	2.402±0.001	金黄色葡萄球菌(100.00)	金黄色葡萄球菌(99.00)
金黄色葡萄球菌	2.434±0.010	金黄色葡萄球菌(100.00)	金黄色葡萄球菌(99.00)
金黄色葡萄球菌	2.350±0.006	金黄色葡萄球菌(100.00)	金黄色葡萄球菌(95.00)
金黄色葡萄球菌	2.339±0.036	金黄色葡萄球菌(100.00)	金黄色葡萄球菌(93.00)
金黄色葡萄球菌	2.344±0.011	金黄色葡萄球菌(100.00)	金黄色葡萄球菌(89.00)
金黄色葡萄球菌	2.501±0.005	金黄色葡萄球菌(100.00)	金黄色葡萄球菌(93.00)
金黄色葡萄球菌	2.483±0.004	金黄色葡萄球菌(100.00)	金黄色葡萄球菌(96.00)
金黄色葡萄球菌	2.387±0.019	金黄色葡萄球菌(100.00)	金黄色葡萄球菌(99.00)
金黄色葡萄球菌	2.454±0.012	金黄色葡萄球菌(100.00)	金黄色葡萄球菌(99.00)
金黄色葡萄球菌	2.388±0.011	金黄色葡萄球菌(100.00)	金黄色葡萄球菌(99.00)
金黄色葡萄球菌	2.423±0.004	金黄色葡萄球菌(100.00)	金黄色葡萄球菌(99.00)
金黄色葡萄球菌	2.436±0.005	金黄色葡萄球菌(100.00)	金黄色葡萄球菌(99.00)
金黄色葡萄球菌	2.429±0.055	金黄色葡萄球菌(100.00)	金黄色葡萄球菌(99.00)
沃氏葡萄球菌	2.220±0.019	沃氏葡萄球菌(100.00)	沃氏葡萄球菌(94.00)
沃氏葡萄球菌	1.896±0.059	沃氏葡萄球菌(100.00)	沃氏葡萄球菌(98.00)
沃氏葡萄球菌	2.200±0.008	沃氏葡萄球菌(100.00)	沃氏葡萄球菌(94.00)
沃氏葡萄球菌	2.262±0.011	沃氏葡萄球菌(100.00)	沃氏葡萄球菌(94.00)
沃氏葡萄球菌	2.378±0.002	沃氏葡萄球菌(100.00)	沃氏葡萄球菌(90.00)
沃氏葡萄球菌	2.208±0.003	沃氏葡萄球菌(100.00)	沃氏葡萄球菌(97.00)
腐生葡萄球菌	2.249±0.026	腐生葡萄球菌(100.00)	腐生葡萄球菌(99.00)
腐生葡萄球菌	2.287±0.009	腐生葡萄球菌(100.00)	腐生葡萄球菌(99.00)
腐生葡萄球菌	2.040±0.063	腐生葡萄球菌(100.00)	腐生葡萄球菌(99.00)
腐生葡萄球菌	2.310±0.023	腐生葡萄球菌(100.00)	腐生葡萄球菌(99.00)
腐生葡萄球菌	2.288±0.066	腐生葡萄球菌(100.00)	腐生葡萄球菌(98.00)
腐生葡萄球菌	2.201±0.013	腐生葡萄球菌(99.80)	腐生葡萄球菌(99.00)
松鼠葡萄球菌	2.001±0.006	松鼠葡萄球菌(100.00)	松鼠葡萄球菌(97.00)
松鼠葡萄球菌	2.046±0.012	松鼠葡萄球菌(99.80)	松鼠葡萄球菌(99.00)
松鼠葡萄球菌	1.930±0.002	松鼠葡萄球菌(100.00)	松鼠葡萄球菌(99.00)
松鼠葡萄球菌	1.983±0.003	松鼠葡萄球菌(100.00)	松鼠葡萄球菌(99.00)
松鼠葡萄球菌	1.951±0.072	松鼠葡萄球菌(100.00)	松鼠葡萄球菌(99.00)
木糖葡萄球菌	2.021±0.085	木糖葡萄球菌(100.00)	木糖葡萄球菌(99.00)
木糖葡萄球菌	1.881±0.129	木糖葡萄球菌(99.80)	木糖葡萄球菌(95.00)
木糖葡萄球菌	2.235±0.017	木糖葡萄球菌(99.85)	木糖葡萄球菌(95.00)
木糖葡萄球菌	1.711±0.037	木糖葡萄球菌(99.61)	木糖葡萄球菌(98.00)
科氏葡萄球菌	2.153±0.004	科氏葡萄球菌(100.00)	克氏葡萄球菌(99.00)
科氏葡萄球菌	2.139±0.016	科氏葡萄球菌(100.00)	科氏葡萄球菌/人葡萄球菌(低分辨率)
人葡萄球菌	2.191±0.058	人葡萄球菌(100.00)	人葡萄球菌(98.00)
人葡萄球菌	2.254±0.036	人葡萄球菌(100.00)	人葡萄球菌(98.00)
人葡萄球菌	2.455±0.009	人葡萄球菌(100.00)	人葡萄球菌(98.00)
表皮葡萄球菌	1.850±0.018	表皮葡萄球菌(99.60)	表皮葡萄球菌(95.00)
表皮葡萄球菌	2.124±0.033	表皮葡萄球菌(100.00)	表皮葡萄球菌(99.00)
表皮葡萄球菌	2.114±0.094	表皮葡萄球菌(99.60)	表皮葡萄球菌(99.00)
肉葡萄球菌	1.983±0.051	肉葡萄球菌(100.00)	科氏葡萄球菌(89.00)
肉葡萄球菌	2.113±0.013	肉葡萄球菌(100.00)	肉葡萄球菌(99.00)
马胃葡萄球菌	2.313±0.016	马胃葡萄球菌(100.00)	马胃葡萄球菌(97.00)
马胃葡萄球菌	2.278±0.008	马胃葡萄球菌(100.00)	马胃葡萄球菌(97.00)
巴氏葡萄球菌	2.255±0.057	巴氏葡萄球菌(100.00)	沃氏葡萄球菌(96.00)
巴氏葡萄球菌	2.193±0.049	巴氏葡萄球菌(100.00)	沃氏葡萄球菌(94.00)
鱼发醇葡萄球菌	1.916±0.001	鱼发醇葡萄球菌(100.00)	模仿葡萄球菌(88.00)
鱼发醇葡萄球菌	1.778±0.003	鱼发醇葡萄球菌(100.00)	模仿葡萄球菌(93.00)
溶血葡萄球菌	2.183±0.042	溶血葡萄球菌(100.00)	溶血葡萄球菌(98.00)
头状葡萄球菌	2.275±0.015	头状葡萄球菌(99.70)	头状葡萄球菌(94.00)
佩氏葡萄球菌	2.223±0.034	佩氏葡萄球菌(99.01)	耳葡萄球菌(99.00)
猴葡萄球菌	2.059±0.028	猴葡萄球菌(94.46)	产色葡萄球菌/路邓葡萄球菌(低分辨率)
琥珀葡萄球菌	1.939±0.001	琥珀葡萄球菌(100.00)	鸡葡萄球菌(99.00)

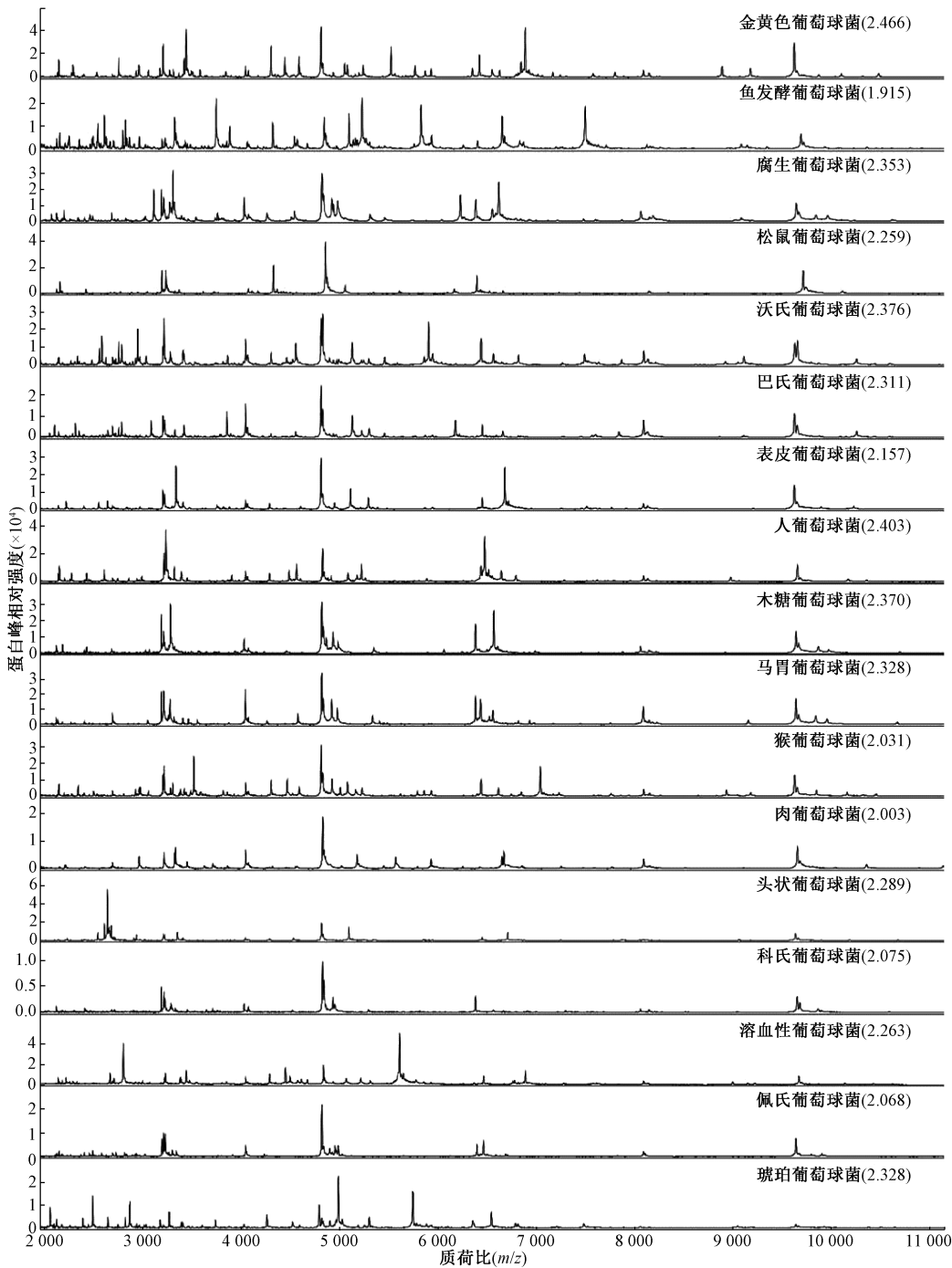


图 1 17 种葡萄球菌的蛋白指纹图谱

Figure 1 Protein mass spectrometric profiles of 17 species of *Staphylococcus*

能被鉴定为葡萄球菌属的其他菌种且可得到很高的鉴定可信度。具体分析 10 株菌鉴定结果出现差异的原因,发现其中有 7 株菌(包括 2 株鱼发酵葡萄球菌、2 株巴氏葡萄球菌、1 株佩氏葡萄球菌、1 株猴葡萄球菌和 1 株琥珀葡萄球菌)是由于细菌种类超出了 GP 卡的鉴定范围。2 株巴氏葡萄球菌鉴定为沃氏葡萄球菌时鉴定报告中明确提示了若有黄色素沉着则有巴氏葡萄球菌的可能性,而其余 5 株菌的鉴定结果不仅错误,而且鉴定分值并不低,有些还达到了 99%,很难发现。其余 3 株菌(2 株科氏葡

萄球菌,1 株肉葡萄球菌)在 GP 卡的鉴定范围内,说明 GP 卡对这两种菌的鉴定效果不佳。结果表明 MALDI-TOF MS 对葡萄球菌属的鉴定能力高于 VITEK 2 Compact,分析结果不一致的葡萄球菌属种类表明,这些菌株同源性较高,有相似的生理、生化表型特征。因此依赖于生化反应的 VITEK 2 Compact 有时就很难区分。

相比 GP 卡可以鉴定 25 种葡萄球菌,布鲁克现有数据库(包括 7 311 个图谱信息)中包括 40 种葡萄球菌的 253 个标准菌株图谱,几乎涵盖了绝大多

数葡萄球菌。国内外已有文献评估了 MALDI-TOF MS 方法对葡萄球菌属的鉴定效果^[10,18], 尽管不同文献涉及的葡萄球菌种类不同, 但是共同的是 MALDI-TOF MS 可准确鉴定葡萄球菌到种水平, 且鉴定分值与葡萄球菌的种类相关。同时, 金黄色葡萄球菌都得到了很好的鉴定。MALDI-TOF MS 可鉴别葡萄球菌的各个种, 这为鉴别引起食品污染的细菌提供了快速的筛选方法。相比 *rpoB* 基因测序和 VITEK 2 Compact 方法, MALDI-TOF MS 方法更加快速、准确。为达到更好的鉴定效果, 现有数据库仍需进一步优化。

参考文献

- [1] 钱坤艳, 帅小博, 徐晓耘, 等. 一起金黄色葡萄球菌肠毒素致食物中毒的病原学鉴定 [J]. 医学动物防制, 2020, 36 (5) : 510-512.
- [2] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中致病菌限量: GB 29921—2013 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [3] BRUMFITT W, HAMILTON-MILLER J M T. Coagulase-negative *Staphylococci* [J]. International Journal of Dermatology, 1983, 22 (4) : 232-234.
- [4] PETTI C A, SIMMON K E, MIRO J M, et al. Genotypic diversity of coagulase-negative *Staphylococci* causing endocarditis: a global perspective [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46 (5) : 1780-1784.
- [5] 鞠慧萍, 葛晴颖, 苏粉良. 几种常见葡萄球菌的性状比较 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2010 (9) : 31-32.
- [6] KIM M, HEO S, CHOI S, et al. Comparison of the MicroScan, VITEK 2, and Crystal GP with 16S rRNA sequencing and MicroSeq 500 v2.0 analysis for coagulase-negative *Staphylococci* [J]. BMC Microbiology, 2008, 8 (1) : 233.
- [7] SHAH M M, IIHARA H, NODA M, et al. *dnaJ* gene sequence based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus *Staphylococcus* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57 (Pt1) : 25-30.
- [8] DRANCOURT M, RAOULT D. *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40 (4) : 1333-1338.
- [9] 肖莎丽, 李硕, 何文秀, 等. 评价基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱对葡萄球菌属的鉴定能力 [J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 20 (24) : 5192-5194.
- [10] ZHU W M, SIERADZKI K, ALBRECHT V, et al. Evaluation of the Biotyper MALDI-TOF MS system for identification of *Staphylococcus* species [J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 117 : 14-17.
- [11] 岳国萍, 刘新, 崔海洋, 等. 两种方法检测食品中金黄色葡萄球菌的结果分析 [J]. 首都公共卫生杂志, 2009, 3 (2) : 46-48.
- [12] TRÜLZSCH K, RINDER H, TRCEK J, et al. "*Staphylococcus pettenkoferi*," a novel staphylococcal species isolated from clinical specimens [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2002, 43 (3) : 175-182.
- [13] 李凤琴, 吴多加, 武淑真, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱鉴定食品真菌影响因素的探讨 [J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19 (6) : 481-488.
- [14] DUBOIS D, GRARE M, PRERE M F, et al. Performances of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50 (8) : 2568-2576.
- [15] KNOESTER M, VAN VEEN S Q, CLAAS E C J, et al. Routine identification of clinical isolates of anaerobic bacteria: matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry performs better than conventional identification methods [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50 (4) : 1504.
- [16] DELMAS J, CHACORNAC J P, ROBIN F, et al. Evaluation of the Vitek 2 system with a variety of *Staphylococcus* species [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46 (1) : 311-313.
- [17] 宋明辉, 李琼琼, 冯震, 等. 葡萄球菌属不同靶基因序列种水平鉴定能力的比较评价研究 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38 (4) : 672-679.
- [18] 孙宗科, 张伟, 陈西平. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱快速鉴定耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 [J]. 卫生研究, 2011, 5 (3) : 99-102.