

方法学分析[J]. 实用医技杂志, 2004, 11(6): 864-865.

[7] 吴汉项. 血清中肌酐的检测方法及其进展[J]. 医药前沿, 2014, 16(31): 92.

[8] 黄玉春, 张春花, 李茹琴, 等. 先天性遗传代谢病的早期诊断[J]. 新生儿杂志, 2005, 20(3): 101-103.

[9] 宋金青, 杨艳玲, 孙芳, 等. 气相色谱-质谱联用分析在有机酸尿症筛查与诊断中的应用[J]. 中国医刊, 2006, 41(2): 38-39.

[10] 许克铭, 王立文, 蔡虹, 等. 气相色谱-质谱法对高危婴幼儿遗传性代谢疾病筛查的研究[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(9): 515-517.

[11] 耿国兴, 李旺, 范歆, 等. 乙酸乙酯萃取-气相色谱-质谱联用技术对 267 例疑似遗传代谢病筛查的结果[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(20): 3289-3290.

[12] 刘志峰, 郭红梅, 练敏, 等. 应用尿液气相色谱-质谱分析法筛查儿童遗传代谢性肝病的临床意义[J]. 实用儿科临床杂志, 2010, 25(8): 575-576.

(收稿日期: 2015-10-11 修回日期: 2015-12-25)

• 临床探讨 •

探讨全自动快速微生物检测系统在鉴定流感嗜血杆菌的应用*

陆伟桃¹, 郭 菁¹, 邓晨晖², 张 文³, 周 强^{3△} (1. 广东省广州市黄埔区红十字会医院检验科 510760; 2. 广东省中医院手术室, 广州 510120; 3. 广东省中医院检验科, 广州 510120)

【摘要】 目的 探讨全自动快速微生物检测系统(VITEK MS)在鉴定流感嗜血杆菌的应用价值。**方法** 收集广州市黄埔区红十字会医院与广东省中医院 2014 年 3 月至 2015 年 1 月从痰液或咽拭子标本中分离的流感嗜血杆菌 35 株, 用 16S rDNA 测序确证。并且用 VITEK MS 质谱仪, API NH 常规生化鉴定与 MH 琼脂平板上 V+X 因子需求性试验 3 种方法对上述菌株鉴定分析。**结果** 在 35 株流感嗜血杆菌细菌中, VITEK MS 质谱仪与 API NH 常规生化鉴定差异无统计学意义($P>0.05$), 而 VITEK MS 与 MH 琼脂平板上 V+X 因子需求性试验差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 对于 API NH 常规生化鉴定与 MH 琼脂平板上 V+X 因子需求性试验, VITEK MS 能快速、准确地鉴定流感嗜血杆菌, 对临床诊治提供很大的帮助, 有非常好的应用前景。

【关键词】 流感嗜血杆菌; 全自动快速微生物检测系统; API NH; V+X 因子; 16S rDNA
DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.07.032 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)07-0944-02

流感嗜血杆菌是专性寄生于人类上呼吸道的常居菌群, 属苛养性细菌, 是社区获得性肺炎的重要致病菌之一^[1]。全自动快速微生物检测系统(VITEK MS)利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS), 是近年来出现的一种新的蛋白质组学的检测方法, 在国外广受关注^[2-5]。本研究以 16S rDNA 基因测序作为“金标准”, 对 VITEK MS 质谱仪, API NH 常规生化鉴定与 V+X 因子需求性试验鉴定效能比较分析, 探讨 VITEK MS 质谱仪在鉴定流感嗜血杆菌的应用价值。

1 材料与方法

- 1.1 材料来源** 35 株流感嗜血杆菌分离自广州市黄埔区红十字会医院及广东省中医院 2014 年 3 月至 2015 年 1 月 1 343 例呼吸道感染患者痰液或咽拭子标本, 并且通过 16S rDNA 检测及测序, 结果用 BLAST 与 Gene bank 数据库中的序列进行比对确证。
- 1.2 试剂与仪器** 嗜血巧克力平板(江门凯琳); API NH 细菌鉴定卡; V+X 因子(英国 OXOID 公司产品); Premix Ex Taq Version 2.0, DL2000 DNA marker(TaKaRa); VITEK MS 质谱仪(法国 BioMrieux 公司), ABI 9700 PCR 仪, Bio-Rad 凝胶成像系统。
- 1.3 方法**

- 1.3.1 细菌分离培养** 所有菌株标本接种在流感嗜血培养基上, 35℃ 孵育箱恒温培养 24~48 h。
- 1.3.2 细菌的生化鉴定** 采用 API NH 细菌鉴定卡, 严格按照说明书操作。
- 1.3.3 X+V 因子需求试验** 质控菌株为流感嗜血杆菌 ATCC49247, 操作按全国临床检验操作规程要求进行。
- 1.3.4 VITEK MS 质谱仪鉴定** 用无菌接种环挑取适量单个菌落涂于质谱仪样品检测板上, 随后再点 1 μL 基质液, 待基质液干燥后放入质谱仪上检测。
- 1.3.5 16S rDNA 检测及测序** DNA 提取试剂盒提取模板 DNA, 进行 16S rDNA 基因 PCR 扩增, 阳性 PCR 产物送 invitrogen 公司进行 DNA 测序, 测序结果用 BLAST 与 Gene bank 数据库中的序列进行比对, 相似度大于 99% 的细菌判定为同种细菌^[5]。
- 1.4 统计学处理** 采用 SPSS18.0 统计软件进行分析, 计数资料以率表示, 比较采用 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。
- 2 结 果**
- 2.1 从 1 343 份痰或咽拭子标本中, 共分离出流感嗜血杆菌株 35 株, 检出率为 2.6%。其中儿童(≤14 岁)占 31%(11/35), 成人(15~60 岁)占 17%(6/35), 老年人(≥60 岁)占 52%**

* 基金项目: 广东省科技计划项目(2011B031800028); 广东省科技计划项目(粤科函规财字[2014]807 号)。
△ 通讯作者, E-mail: zq_zhouqiang@163.com。

(18/35)。

2.2 3 种方法鉴定结果见表 1。VITEK MS 质谱仪与 API NH 阳性检出率差异无统计学意义($\chi^2=0.634\ 9, P>0.05$)，VITEK MS 质谱仪与 V+X 因子阳性检出率差异有统计学意义($\chi^2=3.882\ 9, P<0.05$)。

表 1 VITEK MS 质谱仪、API NH、V+X 因子鉴定结果[n(%)]

种类	VITEK MS	APINH	V+X 因子需求性试验
流感嗜血杆菌	33(94.2)	30(85.7)	26(74.3)
非流感嗜血杆菌	2(5.8)	5(14.3)	9(25.7)
χ^2		0.634 9	3.882 9
P		0.425 6	0.048 8

2.3 VITEK MS、API NH、V+X 因子需求性试验 3 种鉴定方法临床应用特点 见表 2。

表 2 VITEK MS、API NH、V+X 因子需求性试验 3 种鉴定方法临床应用特点

方法	特殊仪器	所需时间	结果判读	操作方法	运行成本
VITEK MS	需要	6~8 min	自动判读	简单	最低
APINH	不需要	5~24 h	肉眼判读	复杂	较低
V+X 因子需求性试验	不需要	24~48 h	肉眼判读	简单	相对较低

3 讨 论

文献[6-8]报道,流感嗜血杆菌是呼吸道正常定植菌,在患者机体抵抗力下降或其他因素影响时,可引起各种急性或慢性呼吸道感染。本组 35 例流感嗜血杆菌的感染患者中老年人(≥60 岁)占 52%,与文献[8]报道一致。这与老年人免疫功能减退,抵抗力下降有关。

近年来,流感嗜血杆菌引起的呼吸道感染日益增加,由于受上呼吸道正常菌群的干扰和抗菌药物滥用严重,其检出率通常较低,不同实验室分离率差异很大,临床上经常出现漏检。本组实验流感嗜血杆菌的检出率仅 2.6%,检出率与胡如华^[7]报道的一致。本文运用 3 种方法对流感嗜血杆菌检测并作比较分析。由本研究结果可知,API NH 与 V+X 因子的鉴定流感嗜血杆菌阳性率分别为 94.2%、85.7%、74.3%,VITEK MS 质谱仪鉴定阳性率较高,但仍然未能达到 100%,可能与嗜血杆菌的数据库还没完善有关,尤其是需要建立嗜血杆菌不同分型的数据库。菌落与基质液共结晶的均匀程度,基质液的保存时间长短,点样是否接触到平板的琼脂部分对鉴定率也存在一定的影响^[2-4]。V+X 因子需求性试验鉴定阳性率仅为 74.3%,与陈东科等^[8]一致,漏检情况比较严重,这与流感嗜血杆菌的培养环境要求高,V+X 因子的保存条件和保存时间的长短,菌液的浓度调配和培养的时间有关。文献[9-10]认为,把 0.5 麦氏比浊菌液调整为 3 个麦氏比浊菌液培养 24 h 可以提高阳性率。但 V+X 因子需求性试验不需要昂贵的仪器,目前还是普遍为基层医院所使用。

API NH 不需要大型的仪器设备,鉴定率较高,与 VITEK MS 质谱差异无统计学意义($P>0.05$),但 API NH 需要时间较长,一般需 5~24 h,操作相对复杂,菌株的传代次数也对生化反应有一定的影响,存在生长不良和生化反应不明显的情况。板条判读结果依赖于人肉眼观察,主观性较强。而 VITEK MS 质谱仅需 6~8 min,操作简单,检测成本较低,能更快地鉴定结果,给出关键信息做药敏试验。

总之,VITEK MS 是快速、操作简单、新型的鉴定技术,尤其在一些要求较高的苛氧菌鉴定上有突出的优势。

参考文献

[1] 臧焕平,赖国祥. 老年人流感嗜血杆菌相关呼吸道疾病研究进展[J]. 医学综述,2007,13(2):119-121.

[2] Van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(3):900-907.

[3] Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, et al. Comparison of two matrixassisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification of bacteria to the species level[J]. Clin Microbiol, 2010, 48(4):1169-1175.

[4] Bizzini A, Durussel C, Bille J, et al. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(5):1549-1554.

[5] Neville SA, Lecordier A, Ziochos H, et al. Utility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry following introduction for routine laboratory bacterial identification[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(8):2980-2984.

[6] Bosshard PP, Zbinden R, Abels S, et al. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(4):1359-1366.

[7] 胡如华. 呼吸道流感嗜血杆菌的分离培养与耐药性分析[J]. 实用医技杂志, 2008, 10(2):460-461.

[8] 陈东科, 张秀珍. 用于嗜血杆菌鉴定的卫星试验影响因素研究[J]. 检验医学, 2004, 19(3):212-216.

[9] 方晓霞, 陈维媚, 王文天, 等. 我院嗜血杆菌分离率和耐药性监测[J]. 中华医院感染学杂志, 2002, 12(12):893-894.

[10] 周慧芳, 杜希利, 张丽萍. 纸片法卫星试验对流感嗜血杆菌鉴定的影响探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 9(9):930-931.