

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.09.012

应用 MALDI-TOF-MS 联合分离胶法快速 鉴定阳性血培养标本的初步研究*

钱扬会,李艳君,丁毅伟,赵强元

(中国人民解放军海军总医院检验科,北京 100048)

摘要:目的 运用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)联合分离胶法快速鉴定血培养阳性标本,探讨快速鉴定法的符合率。**方法** 运用分离胶法提取阳性血培养瓶中富集的菌落,应用 MALDI-TOF-MS 对经前处理的血培养阳性标本进行直接鉴定,鉴定结果与传统的 VITEK-2 Compact 全自动细菌分析仪鉴定结果进行比较,若有不符,以 16SrRNA 序列分析结果作为金标准。**结果** 在实验的 200 株阳性血培养标本中,革兰阳性菌的鉴定符合率达 79.5%;革兰阴性菌鉴定符合率达 85.7%;真菌的鉴定符合率达 20.0%。由此可见,革兰阴性菌的鉴定符合率高于革兰阳性菌,二者鉴定符合率均远高于真菌。两种及两种以上细菌混合感染的阳性标本直接鉴定还存在一定困难,其直接鉴定方式还需进一步探讨。应用两种鉴定方法得出不同结果的 12 株阳性标本,16SrRNA 序列分析结果均与 VITEK-2 Compact 全自动细菌分析仪鉴定结果一致。**结论** MALDI-TOF-MS 联合分离胶促凝管直接检测血培养阳性标本,对血流感染中主要病原菌的鉴定符合率较高,且迅速简便,此方法可将细菌更快地鉴定到种属,使临床能够进行早期治疗,有效控制菌血症的病死率和院内感染。

关键词: MALDI-TOF-MS; 分离胶法; 血培养; 快速鉴定

中图分类号: R446.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)09-1196-04

Preliminary study on identification of positive blood culture specimens by MALDI-TOF-MS combined with separation gel method*

QIAN Yanghui, LI Yanjun, DING Yiwei, ZHAO Qiangyuan

(Department of Clinical Laboratory, Navy General Hospital, Beijing 100048, China)

Abstract: Objective To evaluate the direct identification of microorganisms from blood culture by a separation gel tube-based matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and its identification rate. **Methods** The bacteria were enriched and purified directly from blood culture bottle by separation gel tube, and then the bacteria were identified by MALDI-TOF-MS, and the cultured pure colonies were identified by VITEK-2 Compact automated microbial analysis system (VITEK-2 Compact). The identification of bacterial isolates by MALDI-TOF-MS was compared with that of traditional biochemical testing, and discrepancies were resolved by gene sequencing. **Results** A total of 200 strains of positive blood cultures in the test specimen, gram-positive bacteria identification coincidence rate of 79.5%; gram-negative bacteria identification coincidence rate was 85.7%; fungal identification coincidence rate of 20.0%. Thus, gram-negative bacteria identification coincidence rate is higher than gram-positive bacteria, the identification coincidence rate is much higher than fungi. More than two and the positive samples direct identification of bacteria mixed infection still exist certain difficulties, its direct identification methods had yet to be explored. The results of 16SrRNA sequence analysis of 12 positive samples with different results obtained by the two methods are consistent with those obtained by VITEK-2 Compact automatic bacteria analyzer. **Conclusion** This separation gel tube-based MALDI-TOF-MS for the direct identification of blood culture pathogens is established. The identification rate of common pathogens in bloodstream infection by MALDI-TOF-MS is higher compared with that by traditional culture identification processes. Application of this method can be faster identification of bacteria species, make the clinical ability of early treatment, effective control of the mortality of bacteremia and nosocomial infection.

Key words: MALDI-TOF-MS; gel identification method; bloodstream infection; rapid identification

* 基金项目:海军总医院创新培育基金(CXPY201502)。

作者简介:钱扬会,男,技师,主要从事微生物研究。

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)是近年来发展起来的一种新型的软电离物质谱,应用于临床微生物的病原微生物鉴定。MALDI-TOF-MS 近期的发展主要在提高分辨率,改善灵敏度,扩大应用范围及鉴定标志物等方面,包括建立标准化的前处理程序和详尽全面的数据库,以及优化分析软件。

近年来,随着创伤性诊疗技术的广泛开展及广谱抗菌药物、激素的广泛应用,血流感染的发病率有逐年增高趋势,而血培养被公认为是诊断败血症、菌血症的金标准。目前本院血培养的三级报告的流程如下:将阳性报警的标本转种并涂片进行革兰染色以确定细菌类别,立即报告原始标本直接涂片所见阳性结果,发出一级报告;24 h 后测量抑菌环直径,根据 K-B 法的判定折点,口头报告直接药敏实验结果,并将分离出的单个细菌进行鉴定和药敏,发出二级报告;48 h 后,报告细菌最终鉴定结果和纯菌药敏结果,发出最终报告(三级报告)。由此可见,血培养从阳性报警开始到最终的鉴定药敏结果至少需要 48 h,周期长,诊断及治疗相对滞后。如果能够从临床标本中直接检测细菌,突破细菌培养阳性率低、培养时间长的瓶颈,为细菌感染性疾病的诊疗提供更快、更准确的病原学依据,将对临床及时控制细菌感染性疾病起到更大的作用。国内外学者已尝试将质谱技术应用于临床标本的直接检测,并取得了显著的进展。另外,MALDI-TOF-MS 还大大缩短了细菌鉴定的时间,而且其成本也较常规鉴定方法低^[1-2]。本研究收集了本院 200 例血培养阳性标本,运用 MALDI-TOF-MS 联合分离胶法进行快速鉴定,并与传统培养鉴定方法比较,探讨该方法的临床实际应用价值,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本 所有菌株均为本院 2018 年 6—7 月由临床血培养阳性标本分离出,共计 200 例。其中,革兰阳性菌 88 例,革兰阴性菌 84 例,真菌 8 例,混合菌 20 例。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离及快速鉴定 采用 MALDI-TOF-MS 联合分离胶快速鉴定法,具体步骤如下:抽取阳性血培养标本 3 mL 转移至 INSEPACK® ST740CG 型真空采血管内,混匀,室温下以 3 000 r/min 转速离心 10 min,弃上清液。由于该真空采血管中有分离胶和促凝剂,离心后,血培养阳性标本中大部分杂质和血细胞被分离至分离胶下层,细菌则被富集在分离胶表面。用经过高压处理后的无菌棉签挑取上述分离胶表面的菌体富集物,加入至 75%乙醇溶液 1.0 mL 重悬,混匀后 20 817×g 离心 2 min,取沉淀,点样沉淀 1 μL 至 96 孔金属靶板,室温干燥后,96 孔金属靶板点样甲酸水溶液 1 μL 以裂解细菌菌体,待干燥后点样乙腈 1 μL 用以萃取菌体蛋白,进样至 MALDI-TOF-

MS 系统中进行细菌菌种分析。实验过程按《全国临床检验操作规程》严格执行。参数设置:线性,正离子,蛋白峰谱范围 2 000~20 000 m/z,激光解析每孔至少 240 次。应用 MALDI Biotyper 3 鉴定分析软件显示前 10 位鉴定结果。单菌株血流感染记录质谱评分第一位的细菌菌种。复数菌血流感染时,镜检发现存在不同种细菌感染,例如革兰阴性菌混合革兰阳性菌感染时,分别在革兰阴性菌和革兰阳性菌库中分析质谱图,记录排名首位且质谱评分大于 1.7 分的鉴定结果;镜检存在同属的复数菌时,在相应的革兰阴性菌或革兰阳性菌库中分析,记录首位和第 2 位且质谱评分大于 1.7 分的鉴定结果。

1.2.2 细菌分离及传统鉴定 细菌的分离提纯标本分别接种于血琼脂、麦康凯平板培养基中,置于含有 5% CO₂ 的 35 ℃ 孵箱中孵育 24 h 后,挑取培养基上生长的菌落制备成细菌悬液上机鉴定。细菌鉴定使用法国生物梅里埃公司 VITEK-2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析仪及配套鉴定和药敏卡。所有菌株的分离培养严格按照《全国临床检验操作规程》进行。

1.2.3 质控菌株 采用金黄色葡萄球菌 ATCC 25923;大肠埃希菌 ATCC 25922;克柔假丝酵母菌 ATCC 6258。

2 结果

2.1 单种细菌感染鉴定结果 血培养阳性标本分别应用分离胶联合 MALDI-TOF-MS 法与 VITEK-2 Compact 全自动细菌鉴定与药敏分析仪比较鉴定结果,当两种方法结果不一致时,应用 16SrRNA 序列分析结果作为金标准。将鉴定到菌种的菌株数与菌株总数的比值作为细菌鉴定的符合率。在 84 株革兰阴性菌中,正确鉴定 72 株,正确鉴定的菌株质谱评分均在 1.7 分以上,有 12 株革兰阴性菌未鉴定出或鉴定错误。经计算革兰阴性菌快速鉴定法符合率为 85.7%,见表 1。

表 1 革兰阴性菌快速鉴定法符合率

菌名	菌株数(n)	总株数(n)	符合率(%)
大肠埃希菌	30	30	100.00
肺炎克雷伯菌	26	28	92.86
不动杆菌属	2	4	50.00
产酸克雷伯菌	4	4	100.00
克氏库克菌	2	2	100.00
黏质沙雷菌	2	2	100.00
阴沟肠杆菌	2	2	100.00
少动鞘氨醇单胞菌	2	2	100.00
铜绿假单胞菌	2	2	100.00
唐菖蒲伯克霍尔德菌	0	2	0.00
嗜麦芽窄食单胞菌	0	2	0.00
布鲁氏菌	0	2	0.00
克氏柠檬酸杆菌	0	2	0.00
合计	72	84	85.70

2.2 革兰阳性菌的快速鉴定法符合率 在 88 株革

兰阳性菌中,正确鉴定 70 株,正确鉴定的菌株质谱评分均在 1.7 分以上,有 18 株革兰阳性菌未鉴定出或鉴定错误。经计算革兰阳性菌快速鉴定法诊断率为 79.5%。见表 2。

表 2 革兰阳性菌的快速鉴定法符合率

菌名	菌株数(n)	总株数(n)	符合率(%)
金黄色葡萄球菌	4	4	100.0
头葡萄球菌	14	14	100.0
表皮葡萄球菌	10	10	100.0
溶血葡萄球菌	6	6	100.0
人葡萄球菌	18	18	100.0
屎肠球菌	8	8	100.0
粪肠球菌	4	4	100.0
科氏葡萄球菌解脲亚种	2	2	100.0
沃氏葡萄球菌	2	2	100.0
路登葡萄球菌	2	2	100.0
非发酵棒状杆菌	0	2	0.0
球形赖氨酸杆菌	0	2	0.0
佩滕科费尔葡萄球菌	0	2	0.0
无枝菌酸棒杆菌	0	4	0.0
中间链球菌	0	2	0.0
藤黄微球菌	0	6	0.0
合计	70	88	79.5

2.3 真菌的快速鉴定法符合率 在 10 株真菌标本中,仅正确鉴定出 2 株,其他 8 株真菌标本检测不出,质谱评分在 1.7 分之下,真菌的快速鉴定法符合率为 20.0%。见表 3。

表 3 真菌的快速鉴定法符合率

菌名	菌株数(n)	总株数(n)	符合率(%)
白色假丝酵母菌	2	4	50.0
热带假丝酵母菌	0	4	0.0
克柔假丝酵母菌	0	2	0.0
合计	2	10	20.0

2.4 两种及两种以上混合菌感染鉴定结果 对于混合菌感染的标本,本研究做了 10 例实验,将混合感染的血培养阳性标本直接应用分离胶联合 MALDI-TOF-MS 快速法进行鉴定,鉴定结果见表 4。

2.5 两种鉴定方法的一致性 应用两种鉴定方法得出不同结果的 12 株阳性标本,16SrRNA 序列分析结果均与 VITEK-2 Compact 全自动细菌分析仪鉴定结果一致。

表 4 混合菌快速鉴定法符合率

革兰染色	VITEK-2 Compact	阴性菌库	阳性菌库
革兰阴性杆菌混合革兰阳性球菌	少动鞘氨醇单胞菌表皮葡萄球菌	均未测出	均未测出
	铜绿假单胞菌;粪肠球菌	均未测出	均未测出
	黏质沙雷菌;表皮葡萄球菌	均未测出	均未测出
	弗氏柠檬酸杆菌;屎肠球菌	弗氏柠檬酸杆菌	屎肠球菌
	大肠埃希菌;屎肠球菌	均未测出	屎肠球菌
两种革兰阴性杆菌混合	铜绿假单胞菌;金黄色葡萄球菌	均未测出	金黄色葡萄球菌
	大肠埃希菌;奇异变形杆菌	均未测出	—
两种革兰阳性球菌混合	人葡萄球菌;溶血性葡萄球菌	—	均未测出

注:—表示未检测

3 讨 论

近年来由于静脉导管留置、机械通气、肠外给药等侵入性设备及治疗的广泛应用,免疫抑制剂及大量抗菌药物的滥用,血流感染的发病率逐年上升。因此快速鉴定血流感染细菌菌种,指导临床用药刻不容缓。传统的微生物鉴定流程通常是将血培养标本转种于培养基中,经 18~24 h 后,获得单个菌落,再应用类如 VITEK-2 Compact 全自动微生物分析仪及其配套的革兰阴性菌/革兰阳性菌鉴定卡进行鉴定和药敏实验,需 2~3 d 才能得到结果。对生长缓慢的微生物还需额外时间,或应用 PCR 测序等分子鉴定手段。近年来,有不少的研究应用 MALDI-TOF-MS 直接鉴定临床微生物标本,取得明显进展的是从血培养阳性标本中直接鉴定细菌和酵母样真菌^[3]。MALDI-TOF-MS 仪器主要由基质辅助激光解吸离子源(MALDI)和飞行时间质量检测器(TOF)两部分组成。MALDI 的原理是用一定强度的激光照射标本与基质形成的共结晶薄膜,基质从激光中吸收能量而汽

化,并迅速降解,使标本分解吸附,基质和标本之间发生电荷转移从而使标本分子发生电离;TOF 的原理是带有电荷的标本分子在电场作用下加速飞过飞行管道,因为离子的质荷比与离子的飞行时间呈正比,所以不同质量的离子因达到检测器的飞行时间不同而被检测,以离子峰为纵坐标、离子质荷比为横坐标形成特征性的质量图谱。将不同种属微生物经 MALDI-TOF 分析所形成的质量图谱与数据库中的参考图谱进行比较,从而实现目标微生物或菌株的区分和鉴定。有文献研究表明,有效的抗菌药物治疗每延迟 1 h,感染性休克患者出现低血压后的存活率平均下降 7.6%^[4]。因此本文通过应用分离胶法联合 MALDI-TOF-MS 直接鉴定血培养阳性标本这一快速法指导临床更早用药,对于控制菌血症十分有效。

由于血培养瓶中干扰因素较多,多项研究均对阳性血培养瓶内的培养液进入质谱分析前的预处理流程进行了探索,从而为后续质谱鉴定提供高纯度和高含量的菌体蛋白。目前预处理方式有如下几种:(1)

试剂盒法^[5]。运用德国 Bruker Daltonik 公司厂商推荐的 Sepsityper 配套试剂盒或 MSK 试剂盒,但是其成本较高,随阳性血培养标本量的剧增,将其应用到临床不切实际。(2)将阳性血培养进行短时间(1~4 h)的固相培养^[6]。成本支出较低,但鉴定时长相对延后,未达到快速鉴定的目的。(3)其他方法如细胞溶解过滤方法、实验室内方法优化,操作都较繁琐^[7-8]。本研究采用的分离胶促凝管预处理方法,与以上几种预处理方法相比,存在以下优点和缺点。优点:(1)成本较低、实用性强,只需要真空采血管和低速离心机。(2)检测快速,周转时间短,使用离心富菌方式从血培养瓶中提取病原菌需 15 分钟/标本(Sepsityper kit 法 40 分钟/标本;MSK 试剂盒法 30 分钟/标本),成批处理标本时节约时间。(3)安全性能高,没有过多的转移、洗涤等工序,不容易引起气溶胶等生物安全风险。(4)应用质谱的鉴定方式可鉴定范围广,质谱数据库中储存了超过 2 200 种微生物的特征指纹图谱。缺点是纯度不佳。

根据原国家卫生部全国细菌耐药监测网 2011—2012 年血流感染细菌耐药监测报告显示,我国主要城市三级甲等医院血流感染病原菌最常见细菌依次为大肠埃希菌(23.0%)、凝固酶阴性葡萄球菌(12.3%)、金黄色葡萄球菌(11.4%)、肺炎克雷伯菌(11.3%)、肠球菌属(10.2%)、铜绿假单胞菌(7.2%)及鲍曼不动杆菌(6.5%)^[9]。根据本实验研究结果可知,所统计 180 例单菌株血流感染标本中,分离率较高的细菌依次为凝固酶阴性葡萄球菌(26.6%)、大肠埃希菌(16.7%)、肺炎克雷伯菌(14.4%)、肠球菌属(6.7%)、金黄色葡萄球菌(2.2%)、铜绿假单胞菌(1.1%)及鲍曼不动杆菌(1.1%),上述细菌构成血流感染的主要细菌种类。本院 2018 年 6—7 月所分离的病原菌种类与全国耐药监测网所报道的存在一定差异,但从鉴定结果来看,分离胶促凝管联合 MALDI-TOF-MS 法对于鉴定血流感染的主要细菌鉴定符合率较高。革兰阳性菌的鉴定符合率达 79.5%;革兰阴性菌鉴定符合率达 85.7%,革兰阴性菌鉴定符合率略高于革兰阳性菌,但是对于酵母样真菌的鉴定符合率较低,仅有 20.0%,为此,对于酵母样真菌感染标本的前处理方式上,还需要进行探索和改进。对于混合菌感染标本,分离胶促凝管联合 MALDI-TOF-MS 法直接鉴定符合率也较低,分析导致这种结果的原因可能有:(1)质谱峰的同源性使两种细菌互相影响,当两种混合菌感染同为革兰阴性杆菌或革兰阳性球菌时,均检测不出;(2)4 例革兰阴性杆菌混合革兰阳性球菌感染的标本之中,革兰阳性球菌均被检测出,且质谱评分在 2.0 分以上。涂片镜检血培养标本,发现革兰阳性球菌菌量显著大于革兰阴性杆菌,因此本研究中 4 例革兰阴性杆菌混合革兰阳性球菌,革兰阳性球菌更容易被鉴

定出来。当然,应用分离胶促凝管联合 MALDI-TOF-MS 法直接鉴定混合菌感染的阳性标本,方法还不够成熟,还需进一步实验和研究。

综上所述,分离胶促凝管联合 MALDI-TOF-MS 鉴定符合率较高,且方便快捷,但与传统常规的转种培养鉴定方法相比仍然存在不足之处,所以在实际工作中并不能彻底排除常规的转种培养方法,而应将两种方法互相配合,在更快指导临床用药的同时给予临床最可靠的鉴定结果。

参考文献

- [1] CROXATTO A, PROD' HOM G, GREUB G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology[J]. FEMS Microbiol Rev, 2012, 36(2): 380-407.
- [2] PATEL R. MALDI-TOF mass spectrometry: transformative proteomics for clinical microbiology[J]. Clin Chem, 2013, 59(2): 340-342.
- [3] NONNEMANN B, TVEDE M, BJARNSHOLT T. Identification of pathogenic microorganisms directly from positive blood vials by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry[J]. APMIS, 2013, 121(9): 871-877.
- [4] VLEK A L, BONTEN M J, BOEL C H. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e32589.
- [5] KOK J, THOMAS L C, OLMA T, et al. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper and time of flight mass spectrometry[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23285.
- [6] HAIGH J D, GREEN I M, BALL D, et al. Rapid identification of bacteria from bioMerieux BacT/ALERT blood culture bottles by MALDI-TOF MS[J]. Br J Biomed Sci, 2013, 70(4): 149-155.
- [7] FOTHERGILL A, KASINATHAN V, HYMAN J, et al. Rapid identification of bacteria and yeasts from positive-blood-culture bottles by using a lysis-filtration method and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum analysis with the SARAMIS database[J]. Clin Microbiol, 2013, 51(3): 805-809.
- [8] UKI N, OHO M, NAGASAWA Z, et al. Direct identification method for bacteria in positive blood culture bottles using MALDI biotyper[J]. Rinsho Byori, 2013, 61(3): 224-230.
- [9] 吕媛, 李耘, 薛峰, 等. 卫生部全国细菌耐药监测网(Mohnarín) 2011—2012 年度血流感染细菌耐药监测报告[J]. 中国临床药理学杂志, 2014, 30(3): 278-288.