

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.23.007

尿流式细胞术、MALDI-TOF MS 及 VITEK 2 XL 全自动微生物鉴定系统联合试验对尿培养标本的药敏鉴定结果评价

张肖¹, 杨鸿林¹, 蔡辉^{2△}, 沈昊¹, 顾兵³

1. 苏州市第九医院检验科, 江苏苏州 215200; 2. 江苏盛泽医院检验科, 江苏苏州 215200; 3. 广东省人民医院检验科, 广东广州 510080

摘要:目的 评价尿流式细胞术、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)和 VITEK 2 XL 全自动微生物鉴定系统联合试验对中段尿培养标本直接鉴定结果的可靠性。**方法** 收集 2021 年 1—10 月于苏州市第九医院住院的 296 例泌尿系统感染患者送检的尿培养阳性标本。采用 UF-1000i 进行尿液标本菌量计数, 选择中段尿菌量计数 $>10^5$ 个/毫升的标本, 使用 MALDI-TOF MS 技术进行直接鉴定; 再将中段尿菌量计数 $>10^5$ 个/毫升的标本进行稀释, 使用 VITEK 2 XL 全自动微生物鉴定系统进行直接药敏试验, 将联合试验结果与常规药敏试验结果进行比较, 评价其可靠性。**结果** MALDI-TOF MS 直接法鉴定结果中鉴定到种水平为 93.9%, 鉴定到属水平为 97.6%, MALDI-TOF MS 没有提供可靠的鉴定结果占 2.3%。次代培养后 VITEK 2 XL 鉴定结果符合率为 100.0%。联合试验鉴定结果与常规药敏试验结果差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。革兰阴性菌直接药敏最合适的尿液菌量计数在 500~1 100 个/微升。革兰阳性菌直接药敏最合适的尿液菌量计数在 500~1 500 个/微升。**结论** 联合试验进行阳性尿培养标本的直接鉴定与直接药敏试验可快速、准确地得到鉴定及药敏结果。

关键词:尿流式细胞术; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 全自动微生物鉴定系统; 尿路感染; 药敏试验; 病原菌

中图分类号: R446.11

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)23-3195-04

Evaluation of urine culture specimens identification results by combined method of urine flow cytometry, MALDI-TOF MS and VITEK 2 XL automatic microbial identification system

ZHANG Xiao¹, YANG Honglin¹, CAI Hui^{2△}, SHEN Hao¹, GU Bing³

1. Department of Clinical Laboratory, Ninth Hospital of Suzhou, Suzhou, Jiangsu 215200, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Shengze Hospital, Suzhou, Jiangsu 215200,

China; 3. Department of Clinical Laboratory, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510080, China

Abstract: Objective To evaluate the reliability of urine flow cytometry, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and VITEK 2 XL automatic microbial identification system for direct identification of midstream urine culture specimens. **Methods** From January to October 2021, positive urine culture specimens from 296 patients with urinary tract infection admitted to the Ninth Hospital of Suzhou were collected. UF-1000i was used to count the bacterial count of urine specimens, and specimens with midstream bacterial count $>10^5$ /mL were selected for direct identification by MALDI-TOF MS. Then, the specimens with midstream microbiota count $>10^5$ /mL were diluted, and the VITEK 2 XL automatic microbial identification system was used for direct drug sensitivity test. The results of the combined test were compared with those of the conventional drug sensitivity test to evaluate the reliability. **Results** The direct MALDI-TOF MS method identified 93.9% to the species level, 97.6% to the genus level, and 2.3% were not identified by MALDI-TOF MS. The coincidence rate of VITEK 2 XL identification after subculture was 100.0%. There was no significant difference between the results of combined test and conventional drug sensitivity test ($P > 0.05$). The most suitable urine bacteria count for direct drug sensitivity of Gram-negative bacteria was 500—1 100/ μ L. The most suitable urine bacteria count for direct drug sensitivity of Gram-positive bacteria was 500—1 500/ μ L. **Conclusion** The direct identification of positive urine culture specimens and

作者简介: 张肖, 女, 主管技师, 主要从事微生物检验研究。△ 通信作者, E-mail: 103809573@qq.com.

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20221124.0842.002.html\(2022-11-25\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20221124.0842.002.html(2022-11-25))

the direct drug sensitivity test could get the identification and drug sensitivity results quickly and accurately.

Key words: urine flow cytometry; matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; automatic microbial identification system; urinary tract infection; drug sensitivity test; pathogenic bacteria

尿路感染是临床常见的感染性疾病。近年来,细菌耐药情况日趋严重,泌尿系统病原菌的耐药机制各不相同。为了解住院患者尿路感染病原菌的耐药情况,更好地实现尿培养标本的快速报告,快速提供抗菌药物选择依据,本研究利用 VITEK 2 XL 对住院患者中段尿培养阳性标本进行常规鉴定与药敏试验,并对同一标本进行尿流式细胞术菌量计数、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术直接鉴定。现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 收集 2021 年 1—10 月苏州市第九医院住院的 296 例泌尿系统感染患者送检的清洁中段尿培养阳性标本。

1.2 仪器与试剂 全自动接种仪(法国生物梅里埃公司);VITEK 2 XL 全自动微生物鉴定系统(法国生物梅里埃公司);MALDI-TOF MS 仪及配套试剂(德国布鲁克道尔顿公司);UF-1000i 尿流式细胞仪及配套试剂(希森美康有限公司);血琼脂平板(郑州安图生物技术公司)。

1.3 方 法

1.3.1 尿液标本采集、保存及处理 标本采集按照中华人民共和国卫生行业标准^[1]留取尿液。采集方法包括:清洁中段尿采集、耻骨上膀胱穿刺采集、留置导尿管采集、膀胱导尿采集、婴幼儿尿液采集袋采集及其他不常用的尿液采集方法(如回肠导管导尿采集、间歇性导尿管采集、肾盂造瘘术、输尿管造口术、膀胱镜检查术采集等)。中段尿标本 2 h 内进行接种,否则应置于 4~8 ℃ 冰箱保存,时间不得超过 8 h。

1.3.2 常规鉴定与药敏试验 使用全自动接种仪定量(10 μ L)清洁中段尿接种于血平板,于 35 ℃ CO₂ 培养箱孵育 18~24 h。经次代培养后取平板上的菌落(一种病原菌),根据革兰染色情况,用 0.45% 无菌氯化钠溶液调节菌悬液至 0.50~0.63 麦氏浊度(MCF)。革兰阳性菌采用移液器吸取 280 μ L 菌悬液加入 3.0 mL 0.45% 无菌氯化钠溶液中做药敏试验,分别在两试管放鉴定卡(GP)和药敏卡(GP-67);革兰阴性杆菌采用移液器吸取 145 μ L 菌悬液加入 3.0 mL 0.45% 无菌氯化钠溶液中做药敏试验,分别于 3 试管放鉴定卡(GN)、药敏卡(GN-67 和 XN-04),放入 VITEK 2 XL 全自动鉴定药敏仪充液和上机,6~8 h 后记录仪器检测结果。

1.3.3 直接鉴定(MALDI-TOF MS 直接鉴定法)^[2]

采用 UF-1000i 尿流式细胞仪计数尿液中的菌量,选择中段尿菌量计数 >10⁵ 个/毫升的标本(一种病原

菌)。取收集的清洁中段尿标本 1.0 mL 于 1.5 mL EP 管中,2 000×g 离心 30 s 去除细胞,取上清液于 15 500×g 离心 5 min 收集细菌,取沉渣用无菌生理盐水 500 μ L 清洗 1 次,自然干燥,加 5 μ L 70% 甲酸及 5 μ L 100% 乙腈,混匀,取沉淀物 1 μ L 点靶,室温干燥后加 1 μ L 基质[α -氰基 4-羟基肉桂酸(HCCA)]覆盖,待干燥后用 MALDI-TOF MS 技术进行鉴定。由 MALDI-TOF MS 鉴定分值来确定结果的可靠性。

1.3.4 鉴定结果评定 MALDI-TOF MS 的鉴定分值 ≥ 2.0 时,表示鉴定到种,结果可信;鉴定分值在 1.7~<2.0 时,表示鉴定到属;鉴定分值 <1.7 时,表示鉴定结果不可信。

1.3.5 直接药敏试验 使用 UF-1000i 尿流式细胞仪计数尿液中的菌量,将中段尿菌量计数 >10⁵ 个/毫升的标本按 100~300、500~1 100、500~1 500、1 300~1 900、1 700~1 900 个/微升进行稀释,采用 VITEK 2 XL 全自动微生物鉴定系统进行直接药敏试验,分析结果。

1.3.6 常规药敏试验 尿培养阳性标本转种培养获得纯菌落后,根据细菌的菌落形态及革兰染色情况,分别将革兰阳性球菌悬液稀释后加入至 GP-67 药敏卡,将革兰阴性杆菌悬液稀释后加入至 GN-67 和 XN-04,并使用 VITEK 2 XL 系统进行药敏试验[最低抑菌浓度(MIC)法],具体方法见厂家提供的药敏试验操作程序。药敏试验最终以美国临床和实验室标准化协会(CLSI)推荐的微量肉汤药敏手工法进行药敏试验准确性评估。

1.3.7 判断标准及质控菌株 按照 CLSI《抗微生物药物敏感性试验执行标准》规则进行判断,符合率为实验方法与常规方法的结果一致性。非常重大错误:直接药敏为敏感(S)而常规药敏为耐药(R)。重大错误:直接药敏为 R 而常规药敏为 S。微小错误:直接药敏为 R 或 S 而常规药敏为中介(I),直接药敏为 I 而常规药敏为 R 或 S。质控菌株:大肠埃希菌 ATCC25922、肺炎克雷伯菌 ATCC13883、铜绿假单胞菌 ATCC27853、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、粪肠球菌 ATCC29212。

1.4 统计学处理 采用世界卫生组织细菌耐药性监测网推荐的 WHONET5.6 软件及 SPSS19.0 统计软件进行数据分析。计数资料以例数或率表示,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 VITEK 2 XL 鉴定法与 MALDI-TOF MS 技术直接鉴定法结果对比 在 MALDI-TOF MS 直接法

鉴定结果中,鉴定到种水平的有 278 例(93.9%),鉴定到属水平的 289 例(97.6%),没有提供可靠鉴定结果的 7 例(2.3%)。次代培养后 VITEK 2 XL 鉴定结

果符合率为 100.0%。两种鉴定法的鉴定结果差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 VITEK 2 XL 鉴定法与 MALDI-TOF MS 鉴定法结果对比

病原菌	菌株总数 (<i>n</i>)	MALDI-TOF MS 鉴定法				次代培养后		<i>P</i>
		属水平(1.7~<2.0)		种水平(分值≥2.0)		VITEK 2 XL 鉴定结果		
		株数(<i>n</i>)	符合率(%)	株数(<i>n</i>)	符合率(%)	株数(<i>n</i>)	符合率(%)	
革兰阴性菌	191	191	100.0	182	95.3	191	100.0	0.955
大肠埃希菌	135	135	100.0	131	97.0	135	100.0	0.993
肺炎克雷伯菌	26	26	100.0	25	96.2	26	100.0	0.998
奇异变形杆菌	16	16	100.0	15	93.8	16	100.0	0.997
阴沟肠杆菌	4	4	100.0	4	100.0	4	100.0	1.000
铜绿假单胞菌	3	3	100.0	2	66.7	3	100.0	0.965
鲍曼不动杆菌	3	3	100.0	3	100.0	3	100.0	1.000
其他革兰阴性菌	4	4	100.0	2	50.0	4	100.0	0.835
革兰阳性菌	105	98	95.2	96	89.5	105	100.0	0.884
粪肠球菌	55	52	94.6	50	90.9	55	100.0	0.952
无乳链球菌	10	10	100.0	10	100.0	10	100.0	1.000
屎肠球菌	23	22	95.6	22	95.6	23	100.0	0.997
溶血葡萄球菌	6	5	83.3	5	83.3	6	100.0	0.980
金黄色葡萄球菌	5	5	100.0	5	100.0	5	100.0	1.000
其他革兰阳性球菌	6	4	66.7	4	66.7	6	100.0	0.849
合计	296	289	97.6	278	93.9	296	100.0	0.861

2.2 直接药敏实验结果与常规药敏结果对比

2.2.1 革兰阴性菌

菌量计数 100~300 个/微升与常规药敏试验结果的总符合率、非常重大误差率、重大误差率和微小误差率分别为 99.1%(2 650/2 674)、0.3%(8/2 674)、0.2%(6/2 674)和 0.4%(10/2 674);菌量计数 500~1 100 个/微升与常规药敏试验结果的总符合率 99.9%(2 670/2 674),微小误差 0.1%(4/2 674),未发生非常重大误差和重大误差;菌量计数 1 300~1 900 个/微升与常规药敏试验结果的总符合率 98.9%(2 644/2 674),1 例无结果[0.03%(1/2 674)],重大误差 0.4%(12/2 674),微小误差 0.6%(17/2 674)。由于 CLSI 关于肠杆菌科、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌的药物种类判断标准不一致,所以不同抗菌药物细菌药敏总数不完全一致。分析不同种属革兰阴性菌的药敏结果,肠杆菌目和非发酵菌属直接药敏试验结果中亚胺培南、美罗培南、庆大霉素和左旋氧氟沙星在 3 种菌量计数区间未出现误差,其药敏结果非常可靠。

2.2.2 革兰阳性菌

菌量计数 100~300 个/微升与常规药敏试验结果的总符合率、非常重大误差率、重大误差率和微小误差率分别为 98.7%(1 174/1 190)、0.3%(3/1 190)、0.9%(11/1 190)和 0.2%

(2/1 190);菌量计数 500~1 500 个/微升与常规药敏试验结果的总符合率 99.7%(1 187/1 190),微小误差 0.3%(3/1 190),未发生非常重大误差和重大误差;菌量计数 1 300~1 900 个/微升与常规药敏试验结果的总符合率 99.2%(1 180/1 190),重大误差 0.08%(1/1 190),微小误差 0.7%(8/1 190)。由于 CLSI 关于葡萄球菌属、肠球菌属和链球菌属的药物种类判断标准不一致,所以不同抗菌药物细菌药敏总数不是完全一致。葡萄球菌属、肠球菌属和链球菌属直接药敏试验结果中克林霉素、高浓度庆大霉素、高浓度链霉素和四环素在 3 种菌量计数区间未出现误差,结果可靠。

3 讨 论

常规方法对尿培养阳性标本进行细菌鉴定及药敏实验通常需要 2~3 d 才能出具报告,历时较长。本研究评估了 UF-1000i 与 MALDI-TOF MS 技术的联合直接分析中段尿培养标本中病原菌的效果,该方法减少了病原菌鉴定的时间,再加上直接药敏试验,将结果报告时间至少可提前 24 h,有利于临床及时选择有效的抗菌药物,避免经验用药。

目前,尿培养阳性的 MALDI-TOF MS 技术直接鉴定与仪器法直接药敏试验的研究并不多。2018 年

本课题组研究发现,UF-1000i 进行尿菌量计数 $>10^5$ 个/毫升采用 MALDI-TOF MS 直接鉴定结果可靠^[2]。在此次试验鉴定结果中,MALDI-TOF MS 没有提供可靠鉴定结果的占 2.3%,原因可能是存在一些影响因素,差速离心法并不能完全保证病原菌与细胞和杂蛋白等彻底分离,带有杂质的标本悬液可能造成质谱分值降低,鉴定不出或菌种错判^[3]。目前临床引起尿路感染的病原菌相对比较单一,以大肠埃希菌为主,而采用 MALDI-TOF MS 技术快速鉴定尿标本中病原菌时大肠埃希菌鉴定率高达 92.0%,体现了较高的临床应用价值^[4]。此外,可通过增加差速离心次数和甲酸乙腈萃取步骤,结合尿流式细胞术(有形成分中亚硝酸盐、白细胞酯酶、细菌)等其他辅助手段来提高鉴定率,以实现 MALDI-TOF MS 技术快速鉴定。

本研究结果显示,革兰阴性菌的 MALDI-TOF MS 技术快速鉴定中,鉴定到属的检出率为 100.0%,鉴定到种的检出率为 95.3%;革兰阳性菌鉴定到属的检出率为 95.2%,鉴定到种的检出率为 89.5%。根据革兰阴性菌繁殖速度的生长特点,虽然基本条件是尿菌量计数 $>10^5$ 个/毫升,但研究发现革兰阴性菌的菌量计数显著高于革兰阳性菌,鉴定效果较革兰阳性菌为好^[5]。本研究中,两种鉴定方法的鉴定结果差异无统计学意义($P>0.05$),但直接鉴定在时间上较传统鉴定法快至少 24 h,有明显优势。另外,随着 MALDI-TOF MS 的快速鉴定应用越来越广泛,有学者提出“短期培养法”,4~6 h 后采集菌膜并用 MALDI-TOF MS 直接检测,准确率可得到明显提高^[6]。早期研究有学者报道可通过纸片法(K-B)做直接药敏试验,但近年研究显示,可以通过 MALDI-TOF MS 技术检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌及其表型,以及快速检测泛耐药鲍氏不动杆菌等^[7-8]。

本研究在 MALDI-TOF MS 鉴定结果基础上,对 296 例泌尿系统感染患者尿培养常见细菌直接进行药敏试验。革兰阴性杆菌菌量计数 500~1 100 个/微升时有 4 株出现微小误差,此革兰阴性杆菌计数水平的尿液最合适做直接药敏试验。分析不同种属细菌的药敏结果显示,肠杆菌目和非发酵菌属直接药敏试验结果中亚胺培南、美罗培南、庆大霉素和左旋氧氟沙星在 3 种菌量计数区间未出现误差,其药敏结果非常可靠。在菌量计数 100~300 个/微升出现 8 株非常重大误差,原因可能为尿液菌量计数较少,并未达到仪器检测的菌悬液浓度,也有可能为尿中的蛋白细胞等影响了仪器的检测,导致结果出现误差。而在菌量计数 1 300~1 900 个/微升中出现 12 株重大错误,可能由于尿液菌量计数量较多,尿液中杂质和细胞较多,过于浑浊,导致结果不可靠。革兰阳性球菌菌量计数 100~300 个/微升出现 11 株非常重大误差,原因为仪器法药敏试验中革兰阳性菌较革兰阴性菌需

要的菌量计数量更大,当菌量计数量少时,革兰阳性菌的误差更大。革兰阳性菌的菌量计数 500~1 500 个/微升与常规药敏试验结果的总符合率为 99.7%,微小误差为 0.3%,未发生非常重大误差和重大误差,为革兰阳性球菌最合适的尿液直接药敏试验的菌量计数。葡萄球菌属、肠球菌属和链球菌属直接药敏试验结果中克林霉素、高浓度庆大霉素、高浓度链霉素和四环素在 3 种菌量计数区间未出现误差,结果可靠。本研究发现,直接药敏试验中的菌量计数会影响直接药敏试验结果,其改进措施为可以对中段尿进行差速离心,去除杂质和细胞,并稀释至相应的浓度。

本研究结合尿流式细胞术和 MALDI-TOF MS 的鉴定结果对尿培养阳性标本中常见细菌直接进行药敏试验,其结果与常规药敏试验高度相符。本研究发现,革兰阴性杆菌为泌尿系统感染的主要病原菌,当菌量计数 500~1 100 个/微升可以进行直接药敏试验,这对提高泌尿系统感染患者减少细菌耐药的产生和减轻医疗费用有重要意义;而革兰阳性菌虽然有最适计数,但革兰阳性菌的菌量计数普遍偏小,所以为了减少误差,必须进行培养后再做药敏试验,以免造成错误结果,误导临床治疗。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 尿路感染临床微生物实验室诊断:WST489-2016[S]. 北京:中国标准出版社,2016.
- [2] 张肖,郝天波,吴鸿,等. 尿流式细胞术联合 MALDI-TOF MS 技术直接鉴定尿标本病原菌的应用分析[J]. 中华医院感染学杂志,2018,28(20):3045-3055.
- [3] 许荣琴,杜鸿,谢小芳,等. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术在尿标本微生物快速鉴定中的应用[J]. 检验医学与临床,2018,15(24):3694-3697.
- [4] 徐令清,张冈毅,钟子莹,等. MALDI-TOF MS 直接检测清洁中段尿液标本中病原菌的价值[J]. 国际检验医学杂志,2020,41(22):2748-2751.
- [5] VAN VEEN S Q, CLAAS E C, KUIJPER E J. 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.
- [6] 张景皓,方毅,张艳梅,等. MALDI-TOF MS 结合短期培养法快速检测中段尿液标本中的病原菌[J]. 检验医学,2017,32(4):326-330.
- [7] 李翔,李慧铭,刘正祥,等. MALDI-TOF MS 检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌及其表型的临床应用研究[J]. 检验医学与临床,2020,17(18):2604-2609.
- [8] 黄文辉,吉雪蓉,丛萌倩,等. 应用 MALDI-TOF MS 快速检测泛耐药鲍氏不动杆菌的研究[J]. 中华医院感染学杂志,2019,29(6):805-808.