

## 感染性疾病多学科交叉研究专题

# 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术在病原菌鉴定中的应用

冯琳涵, 程强, 刘丁华, 郑恬, 周柯, 刘家云

(空军军医大学第一附属医院 检验科, 陕西 西安, 710032)

**摘要:** **目的** 探讨基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术(MALDI-TOF MS)在快速鉴定血流感染病原菌的应用价值,并分析MALDI-TOF MS方法鉴定病原菌的准确性。**方法** 收集321例血流感染患者的血液标本进行血培养,微生物室细菌培养结果均为阳性。从血培养阳性瓶中取病原菌至分离胶促凝管中,应用MALDI-TOF MS对富集的病原菌进行菌种鉴定。同时,对血培养瓶中的阳性标本进行常规培养,获得的纯菌落采用VITEK 2 COMPACT微生物分析系统进行检测,并将MALDI-TOF MS检测结果与VITEK 2 COMPACT结果进行对比。若检测结果有差异,则进一步进行基因测序法予以确定。**结果** 321例阳性血培养标本中共分离出180株革兰阴性杆菌, MALDI-TOF MS鉴定准确率为97.78%,无鉴定错误,但4株无鉴定结果;分离出的141株革兰阳性菌中,主要以革兰阳性球菌为主, MALDI-TOF MS鉴定准确率为84.39%,1株蜡样芽胞杆菌误鉴定为大肠埃希菌,出现了菌属水平鉴定错误,其余为种类鉴定错误。**结论** 与传统血培养及生化鉴定比较, MALDI-TOF MS在血流感染中的鉴定符合率较高,且鉴定方法简便、迅速。

**关键词:** 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱; 病原菌; 血流感染; 血培养

中图分类号: R 378; R 552 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2021)14-001-03 DOI: 10.7619/jcmp.20210544

## Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry system in identification of pathogenic bacteria

FENG Linhan, CHENG Qiang, LIU Dinghua, ZHENG Tian, ZHOU Ke, LIU Jiayun

(Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032)

**Abstract: Objective** To explore the value of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in the rapid identification of pathogenic bacteria in bloodstream infections, and to analyze the accuracy of MALDI-TOF MS method. **Methods** Blood samples from 321 patients with bloodstream infection were collected for blood culture, and the results of bacterial culture in microbiology laboratory were all positive. Pathogenic bacteria was taken from the positive blood culture flask and placed into a separate gel tube, and MALDI-TOF MS was used to identify the enriched bacteria; at the same time, the samples were routinely cultured, and the pure colonies obtained were detected by VITEK 2 COMPACT microbial analysis system, and the identification results of the two methods were compared. If there were differences in the test results, further gene sequencing method would be carried out to determine. **Results** Among 321 specimens for blood culture, 180 strains of Gram-negative bacilli were isolated, the identification accuracy rate of MALDI-TOF MS was 97.78%, no identification errors occurred and 4 strains were not identified. Among 141 strains of Gram-positive bacteria isolated, the Gram-positive coccus accounted for the most, and the identification accuracy rate of MALDI-TOF MS was 84.39%. One strain of *Bacillus cereus* was mistakenly identified as *Escherichia coli*, and there was an error in the identification of the genus level; the remaining was identified incorrectly at the level of the species. **Conclusion** Compared with traditional blood culture and biochemical identification methods, MALDI-TOF MS method

has a higher accordance rate in bloodstream infection, and the method is simple and rapid.

**Key words:** matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; pathogen; bloodstream infection; blood culture

血流感染是临床重症感染性疾病之一,具有较高的发病率和致死率,尽早检出致病菌同时精准用药可有效降低病死率<sup>[1-3]</sup>。血培养为诊断血流感染的金标准,但培养及检测时间长,且需得到纯培养菌落后才能进行鉴定及抗生素敏感试验。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)已被报道<sup>[4]</sup>用于直接鉴定血培养标本中的病原菌,其为临床微生物检验提供了一种省时、有效的手段,因而备受微生物人员关注。本研究采用 MALDI-TOF MS 的检测体系对血流感染的病原菌进行检测和鉴定,为临床快速诊断及指导用药提供有力依据,现报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

共纳入 2017 年 4 月—2019 年 4 月西京医院检验科 321 例血流感染患者,收集血液标本并将其放入培养瓶中进行血培养,微生物室细菌培养结果均为阳性(其中需氧瓶 181 瓶,厌氧瓶 100 瓶,儿童瓶 40 瓶)。排除直接涂片革兰染色未见细菌和 2 种以上细菌的血液标本。

### 1.2 仪器与试剂

BACTEC FX400 全自动血培养系统及其配套的需氧瓶、厌氧瓶、儿童瓶及分离胶促凝管均购自美国 BD 公司;血琼脂平板和巧克力平板购自安图公司;甲酸、乙腈、VITEK MS 质谱仪、基质液、靶板、VITEK 2 COMPACT、GN 卡、GP 卡、ANC 卡均购自法国梅里埃公司。质控菌株大肠埃希菌 ATCC8739 由本院微生物室保存。

### 1.3 方法

① 涂片染色镜检:血培养瓶报警后,抽取培养物进行涂片镜检及转种,通过革兰染色镜检初步判定待检菌的种类,并排除样本假阳性干扰并做好镜检记录。

② 菌种常规鉴定:从血培养系统中取出报警为阳性的血培养瓶,混匀后抽取阳性瓶中液体,分别涂布于血琼脂平板和巧克力平板,镜检结果若为真菌加转沙保弱平板,放置需氧或厌氧环境中培养菌种 18~24 h。长出菌落后在平板上挑取单个纯菌落,用棉拭子配制 0.5 麦氏单位菌悬液,根据病原菌的生长特征和染色性,选择合适的板

卡通过 VITEK 2 COMPACT 进行病原菌鉴定。

③ 分离胶促凝管样本预处理:先混匀报警阳性的血培养瓶,用无菌注射器抽取 2.5 mL 血培养瓶中的液体转移至含有促凝剂的真空采血管内,室温下 4 000 g 离心 10 min。离心后小心弃去上清液,分离胶边缘可见灰白色菌膜沉淀,用 1 mL 悬液转移至 1.5 mL eppendorf 管中,加入 200  $\mu$ L 10% 的 SDS,漩涡震荡 1 min,室温放置 5 min 后 13 000 转/min 离心 2 min,小心弃去上清液,沉淀中加入 75% 乙醇 700  $\mu$ L,吹吸混匀,室温放置 10 min,13 000 转/min 离心 2 min,弃去上清液,13 000 转/min 离心 1 min,小心弃去所有上清液。剩余沉淀在生物安全柜中室温放置 5 min,待乙醇完全挥发。

④ MALDI-TOF MS 鉴定:沉淀中加 15  $\mu$ L 浓度为 70% 的甲酸,吹吸混匀,室温放置 5~10 min,加等量乙腈(15  $\mu$ L),吹吸混匀,13 000 转/min 离心 2 min。取 1  $\mu$ L 的上清液滴于靶板,室温晾干。加基质,进样至 MALDI-TOF MS 系统中分析并记录结果。

⑤ 传统微生物培养鉴定结果:采用 VITEK 2 COMPACT 对所有分离菌群鉴定种类,若菌种鉴定准确率为 95% 以上表示鉴定结果可靠。本实验以 VITEK 2 COMPACT 常规鉴定结果为标准,将 MALDI-TOF MS 直接鉴定的结果与其进行比较(MALDI-TOF MS 鉴定结果准确率均为 90% 以上)。

## 2 结果

180 株革兰阴性菌临床分离株中, MALDI-TOF MS 鉴定准确率为 97.78%, 无鉴定错误出现。1 例大肠埃希菌, 1 例肺炎克雷伯菌, 1 例阴沟肠杆菌, 1 例嗜麦芽窄食单胞菌均未鉴定出。

141 株革兰阳性菌临床分离株中, MALDI-TOF MS 鉴定准确率为 84.39%。1 例金黄色葡萄球菌, 1 例表皮葡萄球菌, 1 例屎肠球菌, 2 例粪肠球菌, 1 例溶血葡萄球菌及 1 例蜡样芽孢杆菌存在鉴定错误,其中蜡样芽孢杆菌误鉴定为大肠埃希菌, 11.35% 革兰阳性菌株未鉴定出结果。见表 1。

## 3 讨论

早期准确的病原学诊断是血流感染诊治的关

表 1 321 株临床分离株 MALDI-TOF MS 鉴定结果 [n(%)]

菌属	菌名	VITEK2 COMPAC 方法		MALDI-TOF MS 方法		
		鉴定株数/株	鉴定准确	鉴定错误/株	未鉴定出	
革兰阴性菌 (n = 180)	大肠埃希菌	30	29 ( 96.67)	0	1 ( 3.33)	
	肺炎克雷伯菌	30	29 ( 96.67)	0	1 ( 3.33)	
	铜绿假单胞菌	20	20(100.00)	0	0	
	鲍曼不动杆菌	20	20(100.00)	0	0	
	阴沟肠杆菌	20	19 ( 95.00)	0	1 ( 5.00)	
	黏质沙雷菌	20	20(100.00)	0	0	
	产气肠杆菌	20	20(100.00)	0	0	
	嗜麦芽窄食单菌	20	19 ( 95.00)	0	1 ( 5.00)	
	革兰阳性菌 (n = 141)	金黄色葡萄球菌	30	27(90.00)	1 ( 3.33)	3(10.00)
		表皮葡萄球菌	30	25 ( 83.33)	1 ( 3.33)	4(13.33)
屎肠球菌		20	17 ( 85.00)	1(5.00)	2(10.00)	
粪肠球菌		20	16 ( 80.00)	2(10.00)	2(10.00)	
肺炎链球菌		20	19 ( 95.00)	0	1 ( 5.00)	
溶血葡萄球菌		20	15 ( 75.00)	1 ( 5.00)	4(20.00)	
蜡样芽孢杆菌		1	0	1(100.00)	0	

建,传统的病原微生物主要依靠其形态学特征、生化反应及血清学反应进行鉴定,但这些鉴定方法一般需要 72 h 左右才能完成,容易使危重患者错过最佳治疗时机。应用分子生物学检测病原菌结果准确,但价格昂贵,不适合作为大批量标本的常规鉴定方法。MALDI-TOF MS 技术是一种新型电离技术,能够快速、准确地鉴定培养得到的纯菌落,具有菌种涵盖范围广、准确度高、成本低、实用性强、鉴定速度快、安全性高、易于操作等优点,常规细菌鉴定 24 h 内即可得出鉴定结果<sup>[5-6]</sup>。采用 MALDI-TOF MS 对部分疑难或慢生长致病菌进行鉴定能够显著缩短鉴定时间<sup>[7]</sup>。分离胶促凝管联合 MALDI-TOF MS 方法可提高鉴定效率,但是也存在部分结果不符现象,如本研究将蜡样芽孢杆菌误鉴定为大肠埃希菌,说明在实际工作中不能将此方法彻底代替常规转种培养方法,采用 2 种方法配合使用,取长补短,不仅使 MALDI-TOF MS 检验快速准确,还能保留传统方法准确率较高的优势<sup>[8-10]</sup>。因此,采用 MALDI-TOF MS 方法对血培养细菌快速鉴定的同时进行直接药物敏感性实验,可尽快得出鉴定和药物敏感性结果,有助于缩短患者平均住院时间,降低病死率,减少住院费用<sup>[11-12]</sup>。

综上所述, MALDI-TOF MS 方法直接检测血培养阳性待检菌具有快速、准确、方便、低成本的优势,能够为血流感染患者争取宝贵时间,满足临床早期诊断与干预需求。

#### 参考文献

[1] 朱英娟,王春媛,顾国忠,等. 血流感染的病原学分布和危险因素及抗菌药敏感性分析[J]. 当代医学, 2020, 26 (35): 175-177.

[2] 廖娟,林滢,方凤. 2013—2018 年 948 株血流感染病原菌构成及耐药性分析[J]. 实验与检验医学, 2020, 38(5): 898-902.

[3] 冯琳涵,徐修礼,刘家云,等. 63229 份血培养标本中病原菌群分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(19): 2800-2802.

[4] 方毅,张景皓,赵虎. 分离胶与快速培养富集法在 MALDI-TOF MS 快速检测报阳血培养样本的方法学比较[J]. 老年医学与保健, 2018, 24(6): 705-708, 761.

[5] 田月如,关明,李敏. MALDI-TOF MS 技术在临床微生物诊断应用中的挑战[J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41 (8): 559-562.

[6] 潘宏伟,孙恩华. MALDI-TOF MS 直接鉴定阳性血培养病原菌的前处理方法选择[J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(8): 563-566.

[7] 盛微翔,吴亮,史伟峰,等. 分离胶促凝管联合 MALDI-TOF MS 快速检测血培养阳性瓶中细菌的探讨[J]. 现代诊断与治疗, 2017, 28(22): 4117-4119.

[8] 方盼盼,杨俊梅,杨俊文,等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术在直接鉴定血流感染病原菌中的应用[J]. 中国临床新医学, 2019, 12(5): 518-522.

[9] 王军杰,马冰,李轶,等. 质谱技术直接鉴定报阳血培养细菌可行性分析[J]. 检验医学, 2020, 35(7): 716-720.

[10] 周淑燕,柳丽娟,卓传尚,等. 梅里埃 MALDI-TOF-MS 系统与 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定仪对临床常见病原菌鉴定的一致性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2020 (2): 92-96.

[11] 许春燕,郭锋,上官佳敏,等. 一种联合 MALDI-TOF MS 直接鉴定阳性血培养瓶方法改进及与 Sepsityper Kit 试剂盒法、SELTERS 法和血清分离胶法的比较[J]. 中国微生物生态学杂志, 2020, 32(3): 334-339, 344.

[12] 马立艳,孙伟,苏建荣. MALDI-TOF MS 结合短时培养法在阳性血培养病原菌鉴定中的临床应用[J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(2): 223-224, F0003.

(本文编辑:周冬梅)