

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 快速鉴定革兰阴性杆菌的研究

鲍春梅 陈素明 崔恩博 张鞠玲 王欢 张成龙 曲芬 毛远丽

作者单位:100039 北京市,解放军 302 医院临床检验医学中心

通讯作者:曲芬, E-mail: qf302@163.com

毛远丽, E-mail: maoyuanlee@yahoo.com

【摘要】 目的 评价基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术检测临床常见革兰阴性杆菌的临床应用价值。**方法** 1665 株革兰阴性杆菌经 VITEK2 Compact 鉴定到属和种,采用 MALDI-TOF-MS 对 1665 株革兰阴性杆菌进行种属检测,并计算鉴定正确率。**结果** 1665 株菌包括 27 个菌属,73 个菌种。主要革兰阴性杆菌菌属鉴定整体正确率为 95.7%,菌种整体正确率为 85.5%。其中菌属鉴定正确率最高的是布鲁菌属和沙门菌属,正确率均为 100.0%;菌种鉴定正确率最高的为危险罗尔斯顿菌和摩氏摩根菌,正确率均为 100.0%。**结论** MALDI-TOF-MS 技术鉴定细菌快速、准确、方便,且成本低,适用于临床实验室的快速鉴定诊断。

【关键词】 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱;鉴定;杆菌,革兰阴性

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2012.02.007

The research on rapid identification of gram-negative bacteria by matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry

BAO Chun-mei, CHEN Su-ming, CUI En-bo, et al. The Center of Clinical Laboratory, Medical of 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

【Abstract】 Objective To evaluate the clinical value of matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) in detecting clinical common gram-negative bacteria. **Methods** 1665 strains gram-negative bacterium were detected by VITEK2 Compact, and the MALDI-TOF-MS was used to detecting the genus and species of gram-negative bacteria. And then the identification accuracy was calculated. **Results** 1665 strains gram-negative bacterium including 27 genus and 73 species. The genus overall accuracy of main gram-negative was 95.7%, and the species was 85.5%. The highest accuracy of genus was *Brucella* and *Salmonella* (100.0%). The highest accuracy of species was *Ralstonia insidiosa* and *Morganella morganii* (100.0%). **Conclusion** MALDI-TOF-MS is fast, accuracy, convenience and low cost in bacterial detection. It's applicable for rapid diagnosis of clinical laboratory identification.

【Key words】 MALDI-TOF-MS; Identification; Bacteria, gram-negative

细菌性感染由于起病急、病情重而受到普遍重视,细菌耐药性的迅速上升使临床医生越来越依赖病原学检测的结果。因此,病原学的快速准确鉴定成为临床提高抢救成功率的关键,也是处理突发公共卫生事件和军事战备的必要条件。而由于细菌的生长特性,使其培养和鉴定的速度受到限制,多年来业内一直在探索细菌的快速鉴定方法。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术是近几年快速

发展起来的应用于细菌快速检测的一项技术。其基本原理为将样品与过量的基质溶液点加在样品板上,溶剂挥发后形成样品与基质的共结晶,利用激光作为能量来源辐射共结晶体,基质分子吸收能量与样品解吸附并使样品电离,经过飞行时间检测器,将不同质荷比的离子分开,形成细菌特异性的质谱图。用标准菌株或来源分型明确的菌株建立细菌质谱图库,相关软件将待测细菌质谱图与标准细菌库进行比较,可以确定细菌的种属。传统的方法鉴别细菌和真菌往往需要较长的时间(> 24 h)和复杂的程序,不

利于细菌和真菌的快速鉴定, MALDI-TOF-MS 技术具有快速鉴定、灵敏准确、简便低耗的特点, 对微生物的快速鉴别有重要意义。本文研究对临床分离的常见革兰阴性杆菌采用 MALDI-TOF-MS 技术进行鉴定并评价其临床应用效果。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集分离自我院 2002 年至 2011 年住院患者标本的革兰阴性杆菌 1554 株, 以及 11 株标准菌株, 共计 1665 株。标准菌株购于北京天坛菌种管理中心。所有菌株均已经过 VITEK2 微生物鉴定仪鉴定到属和种, 沙门菌鉴定到血清型。

1.2 仪器与试剂 细菌鉴定采用法国梅里埃生物公司生产的 VITEK2 Compact 全自动微生物分析仪, MALDI Bio-typer 型质谱仪为美国 Bruker Daltonics 公司产品。菌株处理试剂包括甲酸、乙腈、三氟乙酸、无水乙醇, 均由美国 Fisher 公司提供。BTS 标准品、基质 α -氰基-4-对羟基肉桂酸(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, HCCA)由德国 Bruker 公司提供。

1.3 菌株处理 ①在基质和 BTS 标准品中分别加入 200 μ l 和 100 μ l 的标准溶液 (50%乙腈+2.5%三氟乙酸+47.5%超纯水的混合溶液), 超声震荡混匀, -20℃保存备用。②固定灭活: 在 1.5 ml 的 Eppendorf 管中加入 300 μ l 纯净水, 用无菌牙签挑取 5 mg 菌落样品加入 Eppendorf 管中, 充分混匀后再加入 900 μ l 无水乙醇, 再次混匀后, 10 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清, 尽量去除乙醇和水。③蛋白溶出: 在弃去上清的 Eppendorf 管中加入 50 μ l 的 70%甲酸, 充分混匀, 再加入 50 μ l 纯乙腈, 充分混匀, 10 000 r/min 离心 2 min, 吸取上清点靶。④点靶: 先点 1 μ l 上清, 待干后再点 1 μ l 基质, 每个菌在靶位上排列 4 个点, BTS 标准品 1 μ l 放在 96 孔靶的任一位置, 待干后再点 1 μ l 基质, 干燥后上机。⑤采集数据: 放入已点好样品和校准品的靶板, 打开 FlexControl, 校准仪器, 选择数据采集方法, 调好仪器参数, 采用氮基光源, 波长为 337 nm, 线性阳离子检测模式, 加速电压为 15 000 V, 延迟时间为 300 ns, 激光强度为 2500 nm, 每个样本设激光随机射击 40 个点, 每次射击 50 次, 质荷比的采集范围为相对分子质量 $0.1 \times 10^3 \sim 30 \times 10^3$ 。点击 Start 按钮, 采集标准品数据进行仪器校准。然后编辑自动采集方法, 点击 Start 按钮, 采集细菌的样品数据并保存。

1.4 种属判断标准 参照仪器说明书, 根据细菌鉴定的得分范围确定接受程度, 得分 2.3~3.0 为完全可靠地鉴定到种的水平; 得分 2.0~2.2 为可靠鉴定到属

的水平, 有可能鉴定到种的水平; 得分 1.7~1.9 为有可能鉴定到属的水平。

2 结果

2.1 主要革兰阴性杆菌种属鉴定整体情况 主要革兰阴性菌共计 13 个菌属, 1611 株菌, 菌属鉴定的整体正确率为 95.7%, 菌种正确率 85.5%。其他菌属包括单胞菌属、色杆菌属、罗尔斯顿菌属、博德特菌等, 因菌属种类较多, 且每个菌属株数较少, 故在此未做统计。经鉴定的所有菌属中, 正确率最高的是布鲁菌属和沙门菌属, 属鉴定正确率均为 100.0%; 最低的是弧菌属, 属鉴定正确率为 81.8%。各菌属中, 种鉴定正确率最高的是布鲁菌属, 正确率为 100.0%; 最低的是沙门菌属, 种鉴定正确率是 0.0%。见表 1。

表 1 MALDI-TOF-MS 技术鉴定主要革兰阴性杆菌不同菌属、种的情况 [n(%)]

菌属	株数	属正确率	种正确率
布鲁菌属	15	15(100.0)	15(100.0)
沙门菌属	15	15(100.0)	0(0.0)
埃希菌属	491	488(99.4)	488(99.4)
气单胞菌属	57	55(96.5)	21(36.8)
枸橼酸杆菌属	43	41(95.3)	36(83.7)
克雷伯菌属	274	259(94.5)	246(89.8)
不动杆菌属	142	133(93.7)	93(65.5)
假单胞菌属	333	314(94.3)	298(89.5)
变形杆菌属	29	27(93.1)	23(79.3)
沙雷菌属	42	39(92.9)	37(88.1)
肠杆菌属	150	139(92.7)	110(73.3)
摩根菌属	9	8(88.9)	8(88.9)
弧菌属	11	9(81.8)	3(27.3)
合计	1611	1542(95.7)	1378(85.5)

2.2 MALDI-TOF-MS 技术鉴定较好的革兰阴性杆菌菌种情况 1665 株革兰阴性杆菌鉴定正确率较好的菌种中, 最高为危险罗尔斯顿菌和摩氏摩根菌, 鉴定正确率均为 100.0%; 最低的是产气肠杆菌, 鉴定正确率为 76.9%。见表 2。

3 讨论

MALDI-TOF-MS 技术在欧洲及美国的临床实验室应用较多, 并体现了较好的优越性。因为此技术的特殊原理, 使细菌经过基质充分处理后, 细胞内的蛋白成分能够被更好地释放出来, 待这些溶剂挥发后, 蛋白分子和其他细胞组分与基质形成基质结晶, 通过有效的电离而获得清晰的指纹图谱^[1]。不仅适用于培养阳性的革兰阳性细菌和革兰阴性细菌的快速

表 2 MALDI-TOF-MS 技术鉴定较好的

革兰阴性杆菌菌种情况[n(%)]

菌种	数量	种正确率
豚鼠气单胞菌	11	9(81.8)
弗劳地枸橼酸杆菌	34	30(88.2)
产气肠杆菌	39	30(76.9)
阴沟肠杆菌	85	68(80.0)
大肠埃希菌	491	488(99.4)
产酸克雷伯菌	27	25(92.6)
肺炎克雷伯菌	210	193(91.9)
奇异变形杆菌	19	16(84.2)
摩氏摩根菌	7	7(100.0)
黏质沙雷菌	25	24(96.0)
液化沙雷菌	12	10(83.3)
鲍曼不动杆菌	59	46(78.0)
不动杆菌基因种 3 型	14	13(92.9)
铜绿假单胞菌	237	230(97.0)
嗜麦芽寡氧单胞菌	66	51(77.3)
恶臭假单胞菌	6	5(83.3)
危险罗尔斯顿菌	3	3(100.0)

鉴定,也可用于一些难培养的细菌和慢生长细菌如支原体、厌氧菌、丝状真菌、结核分枝杆菌的快速鉴定,文献^[2-6]报道 MALDI-TOF-MS 的应用也较传统的生化反应有更好的可靠性。目前, MALDI-TOF-MS 技术直接鉴定阳性培养瓶或标本的报道^[7,8]也在增加。

MALDI Bio-typer 质谱库中目前储存的 2000 种的细菌,涵盖了临床分离的常见细菌,由于靶板可以重复使用,耗材费用较低,有利于临床推广使用。本文研究结果提示, MALDI-TOF-MS 鉴定革兰阴性杆菌有较快的速度(3-5 min)和较高的正确率,菌属鉴定正确率为 95.7%,菌种鉴定正确率为 85.5%。不同菌属及同一菌属的不同菌种鉴定正确率不同,布鲁菌属、沙门菌属、埃希菌属和气单胞菌属在菌属水平的鉴定正确率在 96.5%以上;而摩氏摩根菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、黏质沙雷菌、不动杆菌基因种 3 型和弗劳地枸橼酸杆菌则有较高(88.2%~100.0%)的菌种鉴定正确率,与 Carbone 等^[9]报道用 Bio-typer 质谱仪鉴定临床细菌的鉴定正确率在属和种的水平分别为 94.9%和 83.4%,以及 Alvarez-Buylla 的研究^[10]提示 Bio-typer 鉴定不动杆菌属中的鲍曼不动杆菌效果较好而其他菌种有待于分子生物学鉴定的情况相似。未鉴定出来的菌种包括沙门菌各血清型、霍乱弧菌、聚团肠杆菌、紫色色杆菌、缺陷短波单胞菌、产吡啶金黄杆菌。部分原因为指纹图谱库数

据不全,没有该菌的图谱;其他原因尚需在以后的工作中逐渐分析和总结。针对腹泻病原菌鉴定效果不理想是由于菌种库数据不全面的问题所致,我院已补充建立了宋内志贺菌的菌种库并经验证取得较好的效果^[11,12]。对于临床实验室常见的分离株而质谱仪尚未涵盖的菌种,本实验室进一步设计并建立质谱库,扩大质谱技术在我国临床细菌诊断中的实用性。

以上结果表明, MALDI-TOF-MS 用于临床微生物的鉴定具有快速、准确、方便、低成本的优越性,较传统的鉴定方法快 16-18 h,为细菌性感染患者,特别是重症患者的救治争取到宝贵的时间,具有很好的应用前景,适合临床实验室的快速诊断,更适合突发疫情及军事战备,具有较好的发展前景。

4 参考文献

- 1 Horneffer V, Forsmann A, Strupat K, et al. Localization of analyte molecules in MALDI preparations by confocal laser scanning microscopy. *Anal Chem*, 2001, 73:1016-1022.
- 2 Vega-Castano S, Ferreira L, González-Avila M, et al. Reliability of MALDI-TOF mass spectrometry in the identification of anaerobic bacteria. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2012, 19.
- 3 Goto K, Yamamoto M, Asahara M, et al. Rapid Identification of *Mycoplasma pulmonis* Isolated from Laboratory Mice and Rats Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J Vet Med Sci*, 2012; 13.
- 4 Cassagne C, Ranque S, Normand AC, et al. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One*, 2011, 6:e28425.
- 5 Pinto A, Halliday C, Zahra M, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. *PLoS One*, 2011, 6:e25712.
- 6 El Khéchine A, Couderc C, Flaudrops C, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice. *PLoS One*, 2011, 6:e24720.
- 7 Bernard La Scola, Didier Raoult. Direct Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry. *PLoS One*, 2009, 4:e8041.
- 8 Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol Jun*, 2010, 48:2110-2115.
- 9 Carbone E, Grohs P, Jacquier H, et al. Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. *J Microbiol*

- Methods, 2012, 89: 133-136.
- 10 Alvarez-Buylla A, Culebras E, Picazo JJ. Identification of *Acinetobacter* species: is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques. *Infect Genet Evol*, 2012, 12: 345-349.
 - 11 He Y, Li H, Lu X, et al. Mass spectrometry biotyper system identifies enteric bacterial pathogens directly from colonies Grown on selective stool culture media. *J Clin Microbiol*, 2010, 48: 3888-3892.
 - 12 鲍春梅, 崔恩博, 陈鹏, 等. MALDI-TOF-MS 鉴定宋内志贺菌的初步应用研究. *传染病信息*, 2012, 25: 10-13.
- (收稿日期: 2012-04-04)
- (本文编辑: 李霖)
-
- (上接第 122 页)
- assay of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in human plasma using normal-phase liquid Chromatography tandem mass spectrometry with a silica column and an aqueous organic mobile phase. *J Chromatogr B*, 1999, 735: 255-269.
 - 16 Mueller CA, Weinmann W, Dresen S, et al. Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a QTrap liquid chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library searching. *Rapid comm. Mass Spectrom*, 2005, 19: 1332-1339.
 - 17 Yang Z, Wang S. Recent development in application of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in therapeutic drug monitoring of immunosuppressants. *J Immunol Methods*, 2008, 336: 98-103.
 - 18 Simpson J, Zhang QL, Ozaeta P, et al. A specific method for the measurement of cyclosporin A in human whole blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit*, 1998, 20: 294-300.
 - 19 Dubbelboer IR, Pohanka A, Said R, et al. Quantification of tacrolimus and three demethylated metabolites in human whole blood using LC-ESI-MS/MS. *Ther Drug Monit*, 2012, 34: 134-142.
 - 20 Morris RG, Salm P, Taylor PJ, et al. Comparison of the reintroduced MEIA assay with HPLC-MS/MS for the determination of whole-blood sirolimus from transplant recipients. *Ther Drug Monit*, 2006, 28: 164-168.
 - 21 Borrows R, Chusney G, Loucaidou M, et al. Tacrolimus monitoring in renal transplantation: a comparison between high-performance liquid chromatography and immunoassay. *Transplant P*, 2005, 37: 1733-1735.
 - 22 Napoli KL. 12-hour area under the curve cyclosporine concentrations determined by a validated liquid chromatography-mass spectrometry procedure compared with fluorescence polarization immunoassay reveals sirolimus effect on cyclosporine pharmacokinetics. *Ther Drug Monit*, 2006, 28: 726-736.
 - 23 Ceglarek U, Lembcke J, Fiedler GM. Rapid simultaneous quantification of immunosuppressants in transplant patients by turbulent flow chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta*, 2004, 346: 181-190.
 - 24 Andes D, Pascual A, Marchetti O. Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53: 24-34.
 - 25 Decosterd LA, Rochat B, Pesse B, et al. Multiplex ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification in human plasma of fluconazole, itraconazole, hydroxyitraconazole, posaconazole, voriconazole, voriconazole-N-oxide, anidulafungin, and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54: 5303-5315.
 - 26 王璨珏, 段京莉. 抗真菌药物进行治疗药物监测的研究进展. *中国新药杂志*, 2011, 20: 224-229.
 - 27 Büchel B, Rhyn P, Schürch S, et al. LC-MS/MS method for simultaneous analysis of uracil, 5,6-dihydrouracil, 5-fluorouracil and 5-fluoro-5,6-dihydrouracil in human plasma for therapeutic drug monitoring and toxicity prediction in cancer patients. *Biomed Chromatogr*, 2012 Mar 27. doi: 10.1002/bmc.2741.
 - 28 Couchman L, Birch M, Ireland R, et al. An automated method for the measurement of a range of tyrosine kinase inhibitors in human plasma or serum using turbulent flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 403: 1685-1695.
 - 29 Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definition and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*, 2001, 69: 89-95.
 - 30 Lee HH, Lim CA, Cheong YT, et al. Comparison of protein expression profiles of different stages of lymph nodes metastasis in breast cancer. *Int J Biol Sci*, 2012, 8: 353-362.
 - 31 Xiao H, Wong DT. Proteomic analysis of microvesicles in human saliva by gel electrophoresis with liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 2012, 723: 61-67.
 - 32 Shetty V, Jain P, Nickens Z, et al. Investigation of plasma biomarkers in HIV-1/HCV mono- and coinfecting individuals by multiplex iTRAQ quantitative proteomics. *OMICS*, 2011, 15: 705-717.
- (收稿日期: 2012-03-04)
- (本文编辑: 李霖)