

MALDI-TOF MS 技术在快速鉴定革兰阴性杆菌血流感染中的应用

吕婕 闫文萍 牛莉莉

作者单位: 831100 新疆维吾尔自治区昌吉回族自治州, 昌吉回族自治州人民医院

通信作者: 牛莉莉, Email: 313939754@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2022.01.015

【摘要】目的 探讨 VITEK MS 质谱仪基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 在快速鉴定革兰阴性(G⁻)杆菌血流感染中的应用。**方法** 收集昌吉回族自治州人民医院 2020 年 1 月—2021 年 12 月检测的血培养阳性瓶, 经涂片染色确认为单一 G⁻ 杆菌的 163 份标本, 采用分离胶促凝管短时培养法, 在规定时间内 (1 h、2 h、4 h、6 h) 内使用 VITEK MS 质谱仪 MALDI-TOF MS 技术进行快速鉴定, 并采用传统转种培养 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析系统验证鉴定结果。**结果** 与传统转种培养法结果比较, 除 4 份未给出鉴定结果外, 其余 159 份样本经 MALDI-TOF MS 技术鉴定结果均相符, 在规定时间内 (1 h、2 h、4 h、6 h) 内成功鉴定率分别为 78.6% (125/159)、85.5% (136/159)、96.2% (153/159)、100.0% (159/159)。**结论** 采用 MALDI-TOF MS 技术结合分离胶促凝管短时培养法, 对病原菌的鉴定时间可由原来的 1~2 d 缩短至 1~6 h, 该方法对血培养阳性 G⁻ 菌的鉴定符合率高, 操作方法简单, 有较好的临床应用价值。

【关键词】 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术; 革兰阴性菌; 血流感染; 短时培养法

Application of MALDI-TOF MS technology in rapid identification of Gram negative bacilli induced bloodstream infection

Lyu Jie, Yan Wenping, Niu Lili. Changji Hui Autonomous Prefecture People's Hospital, Changji Hui Autonomous Prefecture 831100, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Niu Lili, Email: 313939754@qq.com

【Abstract】Objective To explore the application of VITEK MS mass spectrometer matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in rapid identification of Gram negative (G⁻) bacilli induced bloodstream infection. **Methods** The 163 blood culture positive bottles and specimens smear stained as single G⁻ bacilli were collected from January 2020 to December 2021 in Changji Hui Autonomous Prefecture People's Hospital. Using the short-time culture method of separating gel promoting tube, the rapid identification was carried out by VITEK MS mass spectrometer MALDI-TOF MS technology at the specified time points of 1 hour, 2 hours, 4 hours and 6 hours, and the identification results were verified by traditional seed transfer culture using VITEK 2 Compact automatic bacterial identification and drug sensitivity analysis system. **Results** Compared with the results of traditional seed transfer culture method, the identification results of 159 cases by MALDI-TOF MS technology were consistent except 4 cases. The successful identification rates at 1 hour, 2 hours, 4 hours and 6 hours were 78.6% (125/159), 85.5% (136/159), 96.2% (153/159) and 100.0% (159/159), respectively. **Conclusions** The application of MALDI-TOF MS technology combined with short-time culture method of separating gel promoting tube could shorten the identification time from 1-2 days to 1-6 hours. This method has high coincidence rate for the identification of blood culture positive G⁻ bacteria, simple operation method and good clinical application value.

【Key words】 Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry; Gram negative bacterium; Bloodstream infection; Short-time culture method

目前, 临床微生物实验室大多具备开展血培养项目的资质, 大部分微生物实验室也配备了一到两台全自动血培养仪, 如美国 BD 公司和法国生物梅里埃公司建立的全自动血培养检测系统。在系统运行过程中, 当实验室接收临床送检的血培养样本后, 实

验室工作人员只需将培养瓶直接放入血培养仪中, 仪器即可对血培养瓶内的二氧化碳 (carbon dioxide, CO₂) 或其他病原菌代谢产物的浓度变化进行实时监测, 当检测浓度达到阈值后则会提示报警。工作人员取出报阳血培养瓶后, 首先进行涂片的革兰染

色镜检,判断染色性质和病原菌种类,为临床提供血培养一级报告,帮助临床医生根据报告的病原菌种类调整经验用药。传统的血培养从仪器报阳性到发出报告需要 1~2 d 的时间,经转种至琼脂平板后,孵育过夜,在 18~24 h 时获得足够量对数生长期单个纯菌落后,才能进行菌种的鉴定和药敏试验。许多研究人员通过各种方法尽可能缩短检测时间,如采用分子生物学方法对阳性血培养瓶内致病菌直接进行基因检测,但是该方法成本较高,因此未在临床试验中推广。如何快速、有效地获得病原菌种类,为临床医生提供用药依据,缩短患者无效用药疗程,降低医院内抗菌药物的耐药率,成为临床微生物研究中亟待解决的问题。

血流感染是临床常见的严重感染性疾病,具有发病急、病死率高的特点^[1]。当患者发生疑似血流感染时,尽快明确致病微生物,根据药敏特点给予快速有效的经验性抗菌药物治疗,对于感染进程的控制、降低患者经济负担和挽救患者生命都是至关重要的,不仅可以显著提高患者存活率,还可以大大降低医疗费用^[2]。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)是近年发展起来的一种新型生物软电离质谱,能简单和高效地测得细菌肽质量指纹谱(peptide mass fingerprinting, PMF),以数据库查询识别的方式对蛋白质组学进行鉴定,可以大大缩短病原菌鉴定时间,为临床提供快速、准确的治疗依据。当前,国内外学者均曾尝试使用梅里埃 VITEK MS 质谱仪的 MALDI-TOF MS 技术直接检测血培养阳性瓶中的致病微生物,如采用细胞裂解法和分离胶促凝管辅助法等^[3-4]。本研究拟采用 MALDI-TOF MS 技术结合分离胶促凝管短时培养法,在规定时间内(1 h、2 h、4 h、6 h)内直接鉴定阳性血培养瓶中的革兰阴性(Gram negative, G⁻)杆菌,同时进行传统转种培养。采用 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定仪进行细菌鉴定,并以其结果作为标准,将分离胶促凝管短时培养法结果与常规方法进行比较,确定该方法的可行性与准确性。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2020 年 1 月—2021 年 12 月昌吉回族自治州人民医院微生物室 BacT/ALERT 3D 全自动血培养仪检测的报阳血培养瓶,经涂片染色确认为单一 G⁻ 杆菌病原菌感染的 163 份标本,同时

采用分离胶促凝管短时培养法和传统常规转种培养法进行病原体培养。分离胶促凝管短时培养法在规定时间内(1 h、2 h、4 h、6 h)内使用梅里埃 VITEK MS 质谱仪直接鉴定。传统常规转种培养法经过隔夜孵育后,使用梅里埃 VITEK2 Compact 全自动细菌鉴定仪进行鉴定。将阳性血培养液直接涂片革兰染色后证实为单一 G⁻ 菌感染,排除其他致病菌,如酵母样真菌、革兰阳性(Gram positive, G⁺)球菌等。同一患者送检的需氧瓶和厌氧瓶或儿童瓶都纳入其中。

1.2 仪器与试剂 HF151UV CO₂ 培养箱购自济南泰医生物技术有限公司,VITEK MS 质谱仪、BacT/ALERT 3D 全自动血培养仪、VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定仪均购自法国梅里埃诊断产品上海有限公司,TGL-16M 高速离心机由长沙湘仪离心机仪器有限公司提供。VITEK MS-DS 靶板、VITEK MS-CHCA 基质液、血培养瓶、G⁻ 鉴定卡 GN 均购自法国梅里埃诊断产品上海有限公司,血琼脂平板、巧克力琼脂平板均购自郑州安图生物工程有限公司,分离胶采血管由美国 BD 上海有限公司提供,1 μL 一次性接种环购自江苏康健医疗用品有限公司。试剂均在有效期内使用。

1.3 研究方法

1.3.1 血培养及染色镜检 收集不同种类临床血培养样本,包括标准需氧瓶、厌氧瓶、儿童瓶,放入 BacT/ALERT 3D 全自动血培养检测系统进行孵育,当 5 d 内出现阳性报警时,立即取出阳性需氧或厌氧培养瓶,从血培养瓶中以无菌操作抽取培养液,直接进行涂片和革兰染色镜检,确定为单一 G⁻ 杆菌生长的阳性标本,排除假阳性或混合菌感染。

1.3.2 分离胶促凝管短时培养法 在生物安全柜中将阳性血培养瓶瓶口采用 75% 乙醇消毒后,颠倒混匀数次,使用一次性注射器抽取 3 mL 培养液注入含分离胶的黄头真空采血管内,以 3 000 r/min 离心 10 min,用移液器小心弃去上清液,用 1 μL 一次性接种环轻轻刮取分离胶表层菌膜,在血琼脂平板上密涂 2 cm×2 cm 大小转种区,放入 35 ℃、5% CO₂ 恒温孵育箱内进行培养。

1.3.3 MALDI-TOF MS 快速鉴定法 转种培养 1 h、2 h、4 h、6 h 后,分别观察浓集菌生长情况,使用 VITEK MS 质谱仪直接进行鉴定分析。使用 1 μL 一次性接种环挑取标准菌株,将大肠埃希菌 ATCC8739 涂于中心校准位点,并将待测菌涂布于靶板上,待菌膜未完全干燥时加入 1 μL CHCA 基质液,室温下自

然干燥后进行 VITEK MS 质谱分析。

1.3.4 传统转种培养法 将报阳血培养瓶在生物安全柜中以无菌操作抽取适量培养液,涂于血琼脂平板和巧克力琼脂平板上,分区划线,在 35 ℃、5% CO₂ 恒温箱内孵育过夜。18~24 h 后获得足够的单个菌落,观察菌落形态,挑取纯菌落,配制 0.5 麦氏浊度菌悬液,插入 G⁻ 鉴定 GN 卡,使用 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定仪进行细菌鉴定,结果所得致病微生物为标准鉴定结果。

1.4 质量控制(质控) 革兰染色质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 和金黄色葡萄球菌 ATCC25923, MALDI-TOF MS 校准菌株为大肠埃希菌 ATCC8739, 上述菌株均由美国菌种保藏中心提供。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件处理数据,以传统培养法鉴定结果为对照,比较分离胶促凝管短时培养法质谱鉴定结果的准确性,将置信度>85% 的数据作为鉴定结果,将比对准确的数据纳入数据分析,其余均视为鉴定无结果,将鉴定无结果、频谱采集错误、波峰不足、鉴定出≥2 种菌种且置信度低^[5]的鉴定结果予以剔除。

2 结果

2.1 革兰染色与传统鉴定法结果比较 实验期间经革兰染色排除 G⁺ 菌、真菌感染和混合菌感染后,共有 163 份 G⁻ 血培养阳性瓶用于实验,经过 18~24 h 转种培养后,采用 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定仪可鉴定出所有细菌。

2.2 MALDI-TOF MS 快速鉴定法鉴定结果 分离胶促凝管离心后短时培养 1 h、2 h、4 h、6 h 后,分别对 G⁻ 菌采用 VITEK MS 质谱仪直接进行鉴定,除 4 份标本未出结果外,鉴定成功率分别为 78.6%、85.5%、96.2%、100.0%。见表 1。

表 1 不同培养时间的 G⁻ 菌鉴定成功率

G ⁻ 菌培养时间	样本数(份)	鉴定成功率[%(份)]
1 h	159	78.6(125)
2 h	159	85.5(136)
4 h	159	96.2(153)
6 h	159	100.0(159)

注:G⁻ 为革兰阴性,鉴定成功为置信度达到 85%

2.3 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定仪与 MALDI-TOF MS 结果比较 将传统培养法 VITEK2 Compact 全自动细菌鉴定仪鉴定结果与 MALDI-TOF MS 快速鉴定法在 1 h、2 h、4 h、6 h 时间段内可鉴定到属种的菌株数进行比较,结果见表 2。

表 2 G⁻ 菌在不同时间段的鉴定结果

G ⁻ 菌	传统培养法(株)	MALDI-TOF MS(株)				
	>24 h	1 h	2 h	4 h	6 h	
大肠埃希菌	89	70	76	85	89	
肺炎克雷伯菌	52	42	45	50	52	
阴沟肠杆菌	2	2	2	2	2	
奇异变形杆菌	2	1	2	2	2	
鲍曼不动杆菌	8	6	6	8	8	
铜绿假单胞菌	6	4	5	6	6	
合计	159	125	136	153	159	

注:G⁻ 为革兰阴性, MALDI-TOF MS 为基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

3 讨论

据国内文献报道,每年世界范围内患者病死率统计中,血流感染引起的死亡患者数都在较高水平,住院患者院内脓毒症发病率为 48.56/10 万^[6],总病死率约为 30%~40%^[7]。对于脓毒性休克伴低血压的患者来说,每延迟 1 h 采取有效抗菌治疗就会导致患者的平均存活率降低 7.6%^[8]。因此,快速准确的血培养结果可以更好地帮助和指导临床科学合理用药,及时治愈患者^[9]。对引起血流感染的病原微生物进行快速、准确的鉴定对保障患者的生命安全至关重要。

传统的血培养从报阳到发出鉴定到属或种的最终报告,需要 1~2 d 的时间,耗时较长,不仅无法满足临床需要,还会造成医患矛盾的产生。一些核酸检测技术[如荧光实时定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)等]虽然可以快速鉴定出导致患者血流感染的病原菌,但是检测的成本高,耗时较长,操作流程复杂,鉴定菌种种类受限于引物,并且需要专业技术人员进行操作,因此临床应用率较低。还有学者采用多次洗涤、离心的方法获得病原菌,进行生化反应鉴定,可以使报告周期有所缩短,但时效上仍然不及 VITEK MS 质谱仪 MALDI-TOF MS 技术的应用。

MALDI-TOF MS 技术将琼脂平板上生长的单个菌落点涂于靶板上,与基质溶液充分作用后,在质谱仪内接受多次激光照射,在电荷解离过程中,基质吸收激光并与菌体一起解吸。电场引导离子进入真空管,根据质量及飞行时间分离离子,较小的分子飞行速度较快,并以一系列线或峰显示结果。通过分析质谱片段推导出分子结构,与大量细菌种属生成的质谱数据库进行比对,获得达到可信水平的微生物鉴定结果。既往研究中,将 MALDI-TOF MS 技术应用于单一病原菌血流感染时,菌株鉴定的准确率

可达到 66%~97%,但处理阳性血培养液往往需要繁琐的人工操作以获得足量、纯化的病原菌蛋白,方能进行质谱分析^[2]。本研究中,我们采用真空分离胶采血管一步离心法将病原菌与血浆和血细胞分离,用时仅 10 min,收集病原菌后短时培养,利用 MALDI-TOF MS 技术进行特征性蛋白波峰分析,对临床血流感染常见的细菌均获得了比较满意的鉴定结果。该方法仅需额外使用真空分离胶采血管和离心机,步骤简单,操作简便,使用仪器也都是实验室的常备仪器,适用于实验室日常工作。

MALDI-TOF MS 技术既可以对临床标本分离出的纯菌落进行鉴定,也可以对临床上未经分离培养的标本进行直接鉴定,与常规生化反应鉴定方法比较,可以大大缩短细菌鉴定时间,使时效性明显改善,极大地缓解了临床压力,为临床争取宝贵的治疗时间,在试剂成本上也更为低廉,更具有临床推广价值。本实验通过含分离胶的采血管离心处理阳性标本,能将碳粉及大部分红细胞分离至分离胶下层,使细菌聚集在上层血清与分离胶的交界处,为细菌的快速提取提供了有利条件。有学者在既往关于血培养阳性菌直接鉴定的研究中发现, MALDI-TOF MS 技术对 G⁻ 菌的鉴定成功率较高,这也是用较少时间就能获得较高鉴定符合率的原因之一。本研究 159 份 G⁻ 菌中,有 85.5% 的菌株在培养 2 h 时就能被成功鉴定,高于已有的一些同类研究中 G⁻ 菌血流感染鉴定成功所占的比例^[10]。

与使用传统方法鉴定出致病菌比较,本实验 VITEK MS 鉴定中有 2% (4/163) 的鉴定无结果的原因可能是由于血培养标本中菌种浓度较低,或碳粒、血细胞碎片等有形成分的存在,也可能是在离心过程中蛋白质丢失,导致细菌鉴定的效果不佳。

本实验结果表明,采用 MALDI-TOF MS 技术对分离胶促凝管短时培养法在琼脂培养基上经过短时培养的血培养阳性标本进行快速病原菌鉴定是一个早期可靠的方法,并且不需要额外的标本预处理试剂及裂解、洗涤等日常鉴定流程以外的步骤。本方法的另外一个缺点就是由于质谱本身的局限性,对于多重菌株感染的血培养标本不能进行鉴定,因此标本的来源极为有限,且因地区有所差异,也不适用于其他地区。

综上所述,本研究利用梅里埃 VITEK MS 质谱仪 MALDI-TOF MS 技术,与分离胶促凝管短时培养法在规定时间 (1 h、2 h、4 h、6 h) 内直接涂布于靶板

进行快速鉴定,对 G⁻ 杆菌所致的血流感染阳性血培养标本具有较高的菌种鉴定准确率,可以大大缩短病原菌鉴定时间,有助于临床及时获取病原菌种类。血培养作为诊断血流感染的“金标准”^[11],也可以为临床精准治疗提供依据。本研究只是对该方法的实验室可行性进行评估,但此方法会对临床用药带来哪些影响和改变尚未可知。MALDI-TOF MS 技术对给予患者有效抗菌药物治疗、改善患者预后、降低医疗成本具有至关重要的临床应用价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- 1 孙琪,郭微媛.血培养病原菌的分布及耐药性分析[J].实用检验医师杂志,2011,3(4):226-229. DOI:10.3969/j.issn.1674-7151.2011.04.009.
- 2 ROMERO-GOMEZ M P, GOMEZ-GIL R, PANO-PARDO J R, et al. Identification and susceptibility testing of microorganism by direct inoculation from positive blood culture bottles by combining MALDI-TOF and Vitek-2 Compact is rapid and effective [J]. J Infect, 2012, 65 (6): 513-520. DOI: 10.1016/j.jinf.2012.08.013.
- 3 TANNER H, EVANS J T, Gossain S, et al. Evaluation of three sample preparation methods for the direct identification of bacteria in positive blood cultures by MALDI-TOF [J]. BMC Res Notes, 2017, 10 (1): 48. DOI: 10.1186/s13104-016-2366-y.
- 4 陈峰,李媛睿,皇甫昱婵,等.分离胶促凝管联合 MALDI-TOF MS 直接检测血培养阳性细菌[J].检验医学,2015,30(2):113-121. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2015.02.004.
- 5 MESTAS J, FELSENSTEIN S, BARD J D. Direct identification of bacteria from positive BacT/ALERT blood culture bottles using matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2014, 80 (3): 193-196. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.07.008.
- 6 龚雅利,刘春江,汤荣睿,等.血液感染病原菌的分布及耐药性分析[J].国际检验医学杂志,2010,31(2):107-108. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2010.02.002.
- 7 刘俊,陶建平.革兰氏阳性球菌和革兰氏阴性杆菌菌血症的临床对比[J].医学信息(下旬刊),2010,23(10):15-16.
- 8 KUMAR A, ROBERTS D, WOOD K E, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock [J]. Crit Care Med, 2006, 34 (6): 1589-1596. DOI: 10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9.
- 9 喜贺热,崔永强.151 株血培养分离菌的分布及耐药性分析[J].实用检验医师杂志,2014,6(4):230-233. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2014.04.010.
- 10 吴文娟.血流感染的快速诊断:从病原到宿主整体策略[J/CD].中华临床实验室管理电子杂志,2015,3(2):68-71. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-5820.2015.02.002.
- 11 申凤彩,解迪,韩钱鹏,等.ICU 血流感染病原菌特征及混合血流感染的危险因素分析[J].中华危重病急救医学,2015,27(9):718-723. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.09.004.

(收稿日期:2022-01-25)

(本文编辑:邵文)