

• 论 著 •

分离胶辅助 VITEK-MS 质谱仪快速鉴定血培养阳性菌的方法学研究*

蒋月婷¹, 黎健成², 易建云^{1△}, 陈定强¹

(1. 广州医科大学附属第一医院检验科, 广州 510120; 2. 广州医科大学金域检验学院, 广州 510260)

摘要:目的 探讨用分离胶采血管联合基质辅助激光解析电离飞行时间质谱系统(VITEK-MS)快速鉴定血培养阳性菌的方法。方法 收集 2015 年 3~10 月广州医科大学附属第一医院 BacT/ALERT3D 血培养仪报阳性, 且直接涂片染色为革兰阴性菌的血培养标本 50 例, 通过分离胶采血管直接从血培养瓶中提取细菌, 采用 VITEK-MS 对细菌进行快速鉴定; 同时用常规方法对细菌进行转种培养及鉴定, 比较该方法的鉴定符合率。结果 50 例血培养阳性的革兰阴性菌中, 21 例鉴定不出细菌名, 29 例鉴定出细菌名, 阳性率 58.0%, 与常规鉴定方法阳性正确率为 96.6%; 分离胶联合 VITEK-MS 较常规法提前近 24 h。结论 采用分离胶集菌联合 VITEK-MS 鉴定细菌的方法, 对血培养阳性革兰阴性菌的鉴定符合率高, 可以大大缩短鉴定的时间, 方法快速、简便。

关键词:分离胶采血管; VITEK-MS 质谱鉴定系统; 血培养

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.15.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)15-2071-03

Methodological study of VITEK-MS assisted by separation gel tube for fast identification of positive blood culture bacteria*

JIANG Yueying¹, LI Jiancheng², YI Jianyu^{1△}, CHEN Dingqiang¹

(1. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China; 2. KingMed School of Laboratory Medicine, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510260, China)

Abstract: Objective To investigate the method of the separation gel vacuum tube combined with matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry system(VITEK-MS) for fast identifying positive blood culture bacteria. **Methods**

Fifty cases of positive blood culture by the BacT/ALERT3D blood culture system and Gram-negative bacteria by direct staining in the First Affiliated Hospital of Guangzhou University from March to October 2015 were collected. The bacteria were directly extracted from the blood culture bottle by the separation gel tube and performed the fast identification by adopting the VITEK-MS system. At the same time the bacteria were performed the subcultivation and identification, then the coincidence of this method was compared. **Results** Among 50 cases of Gram-negative bacteria by positive blood culture, 21 cases of bacteria were not identified, 29 cases of bacteria were identified, the positive rate was 58.0%, the coincidence rate with the conventional identification results was 96.6%; the method of separation gel combined with VITEK-MS was nearly 24 h in advance compared with the traditional method.

Conclusion Adopting the separation gel vacuum tube combined with VITEK-MS for identifying bacteria has the higher coincidence rate of positive blood culture Gram negative bacteria, can greatly shorten the identification time, this method is rapid and simple.

Key words: separation gel tube; VITEK-MS; blood culture

血流感染是临床上重症感染性疾病之一, 致死率高, 快速诊断是控制感染、降低病死率的关键。而传统的微生物鉴定方法主要包括培养和生化试验等, 需要的时间长、鉴定范围窄, 影响了病原微生物鉴定的速度和准确性。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)是近些年发展起来的一种新型的细菌鉴定技术。随着技术不断改进和数据库完善, MALDI-TOF MS 已可在细菌不经过前处理的情况下直接检测细菌, 因而被认为是鉴定细菌最有效的方法^[1]。法国生物梅里埃公司的质谱系统 VITEK-MS 是利用 MALDI-TOF 质谱技术来分析检测菌株蛋白组成成分, 获得特征性的峰谱, 与数据库中细菌图谱进行比较, 能够吻合即可作出判断, 从而快速鉴定细菌。本研究对全自动血培养仪报阳的直接涂片镜检为革兰阴性菌的标本, 采用分离胶采血管直接分离收集细菌, 用 VITEK-MS 质谱仪对待检菌进行鉴定; 同时以常规方法对血培养阳性标本进行培养及鉴定, 比较两者鉴定结果一致性; 以探讨该快速检测方法的可行性。

1 材料和方法

1.1 标本来源

收集 2015 年 3~10 月广州医科大学附属第

一医院 BacT/ALERT3D 全自动培养仪报阳的血培养标本 50 例, 且瓶中培养液直接涂片染色镜检为革兰阴性菌(需氧或厌氧菌), 并于当天完成分离胶提菌及 VITEK-MS 直接鉴定。同一患者的需氧培养瓶和厌氧培养瓶也算入其中。

1.2 仪器和试剂 BacT/ALERT3D 全自动血培养仪、血培养瓶、哥伦比亚血琼脂平板、质谱样品处理基质溶液、VITEK-MS DS 靶板、VITEK-MS 质谱系统、VITEK 2 全血自动细菌鉴定系统、MYLA 实验室全自动工作站购于生物梅里埃中国有限公司; 分离胶采血管购自 BD 公司; 5415D 高速台式离心机购于 Eppendorf 公司; 一次性接种环购于 COPAN 公司; 质谱校准参考菌株 ATCC8739 大肠埃希菌由本院微生物室保存。所有试剂均在有效期内。

1.3 方法

1.3.1 收集并确认血培养阳性标本 当 BacT/ALERT3D 全自动血培养仪报警, 立即取出阳性需氧或厌氧培养瓶, 从瓶中抽取培养液直接涂片染色镜检, 确定有革兰阴性杆菌生长的为阳性标本, 排除假阳性。血培养瓶为加入碳粒的中和抗菌药物瓶或是不含碳粒的普通瓶。

* 基金项目: 广东省科技计划项目(2013B021800272)。

作者简介: 蒋月婷, 女, 副主任技师, 主要从事临床常见细菌耐药机制研究。△ 通讯作者, E-mail: liangrgy@163.com。

1.3.2 分离胶采血管初步处理标本 将血培养瓶摇匀,用无菌注射器吸取 3 mL 培养液,并注入到分离胶采血管内,室温下,3 000 r/min 离心 2 min,通过离心能将碳粉及大部分红细胞分离到分离胶下层,而细菌则离心至分离胶上层沉淀及上清液中,将离心后的上清液转移至 EP 管。

1.3.3 高速离心收集细菌 先将 EP 管离心,5 000 r/min 离心 5 min,弃去 EP 管中的上清液;再加入 200 μ L 生理盐水于 EP 管中,混匀,8 000 r/min 离心 5 min,最后弃去上清液,得到沉淀物备用。

1.3.4 质谱鉴定 用 1 μ L 一次性接种环轻轻刮取 EP 管上层细菌少量,点样在金属靶板的样品孔中,后加入 1 μ L 质谱样品处理基质溶液覆盖样品,室温待干后将靶板放到 VITEK-MS 质谱仪进行鉴定。当涂抹细菌时做到尽量薄、均匀,每个样品双孔检测,每次取培养 15~18 h 的 ATCC8739 校准菌株纯菌点样于靶板质控孔。

1.3.5 常规培养鉴定 将 BacT/ALERT3D 全自动血培养仪报阳的血培养瓶取出,从瓶中抽取培养液直接涂片革兰染色镜检,同时取少量培养液接种于血琼脂平板,需氧或厌氧环境中孵育 18~24 h 后,挑取平板上的纯菌落,调菌液浊度后选用 GN 卡,放到 VITEK 2 系统进行鉴定。鉴定结果以常规培养鉴定方法的结果为准。

1.3.6 质谱鉴定结果及比较分析 VITEK-MS 质谱系统的

鉴定结果包括能够鉴定到种或属、频谱错误、无鉴定结果、波峰不足等情况。能鉴定到种或属的结果为阳性,其他情况为结果阴性。将该方法与常规培养鉴定方法比较,计算阳性正确率,阳性正确率为该实验方法鉴定结果阳性的标本数与常规培养方法的鉴定结果相一致的概率。

2 结 果

2.1 分离胶采集管联合 VITEK-MS 质谱检测结果 50 例血液培养阳性的革兰阴性菌标本检测结果见表 1。从表 1 可见,血流感染革兰阴性菌标本中需氧菌占 98%(49/50),厌氧菌只占 2%(1/50);需氧菌中大肠埃希菌最为常见,占 70%(35/50),其次是鲍曼不动杆菌。本实验方法直接检测大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的鉴定效果较差,检出率低,出现鉴定不出(42.0%)及鉴定错误(2.0%)的结果。

2.2 快速法与常规培养鉴定方法结果比较 与常规培养鉴定方法比较结果见表 1。50 株革兰阴性菌的种类分为 8 种,除常见菌外还包括不常见的沙门伤寒菌、胎儿弯曲菌胎儿亚种及厌氧菌类腐败梭菌,分离胶采集管联合 VITEK-MS 质谱检测对这些不常见菌的鉴定结果与常规方法结果一致,符合率达 100%。而对常见的大肠埃希菌的鉴定,其符合率却较低。

本实验方法从培养液注入分离胶采集管开始到 VITEK-MS 质谱检测出结果所需时间在 2 h 内,而用常规培养鉴定方法鉴定出结果所需时间平均为 24~48 h。

表 1 分离胶采集管联合 VITEK-MS 质谱检测结果

细菌名称	<i>n</i>	鉴定到种或属(<i>n</i>)	鉴定错误(<i>n</i>)	鉴定不出(<i>n</i>)	检出率(%)	阳性正确率(%)
大肠埃希菌	35	16	1	18	48.6	94.1
铜绿假单胞菌	3	2	0	1	66.6	100.0
鲍曼不动杆菌	6	5	0	1	83.3	100.0
肺炎克雷伯菌	1	0	0	1	0.0	0.0
嗜麦芽窄食单胞菌	1	1	0	0	100.0	100.0
沙门伤寒菌	2	2	0	0	100.0	100.0
胎儿弯曲菌胎儿亚种	1	1	0	0	100.0	100.0
厌氧菌类腐败梭菌	1	1	0	0	100.0	100.0
总计	50	28	1	21	58.0	96.6

3 讨 论

菌血症和败血症是严重危及患者生命的疾病,传统的培养鉴定方法耗时长,无法满足临床急诊所需,如何对血培养阳性标本进行快速、准确的菌种鉴定成为重中之重。国内外不少学者为此不断进行实验,以攻克这一难题,使致病菌在短时间内鉴定出来成为了可能。根据不同细菌所特有的蛋白,应用 MALDI-TOF MS 使细胞表面蛋白质形成不同的模式峰,与人类病原体数据库中的蛋白质指纹图谱进行比较,从而对该微生物的类别进行鉴定,这是一种与传统鉴定方法完全不同的新型鉴定手段^[2]。生物梅里埃公司的 VITEK-MS 就是基于 MALDI-TOF 原理运用于微生物鉴定的全自动质谱系统,在 2012 年通过国家食品药品监督管理局的批准后,标志了 VITEK-MS 将真正进入临床微生物诊断。

与传统的生化及表型鉴定方法对比,VITEK-MS 具有操作简单、快速、自动化程度高、高通量的特点^[3]。VITEK-MS 既可以对临床标本分离出的纯菌落进行检测,也可以对临床上未经分离培养的标本进行直接检测^[4]。由于血培养标本中碳粒、血细胞等有形成分的存在,影响直接用阳性标本作细菌鉴定的效果及判定。本研究采用含分离胶的采血管处理阳性标本,离心后得到无血细胞的菌液。分离胶分离血液标本主要是

因为碳粒和血细胞的比重大,经离心后处于下层,而血清及细菌比重较分离胶小,处于上层^[5],经离心后细菌在上层血清及血清与分离胶的交界处,为细菌的提取提供了条件。对于离心的速度,如果离心力过低,作用于分离胶的力较弱,使分离胶返转性不佳,可出现纤维蛋白凝状物停留在血清中或胶体层中。相反,如果离心时间过长,在分离胶凝聚体中由于氢键被切断后再难以形成网状结构,而失去触变性^[6]。

本研究分离胶采集管联合 VITEK-MS 质谱快速检测方法有以下优点:(1)速度快。血液经无菌注射器抽离后注入到分离胶采血管中,低速离心后再经两次高速离心便可收集病原体,然后直接对沉淀物中的病原菌进行鉴定,病原菌的鉴定结果在 2 h 内便可得到,所需时间远远小于传统分离纯化菌落再鉴定的方法(24~48 h)。(2)成本低。所需试剂在各大医院普遍使用,标本处理中所需仪器仅为离心机,试剂成本比 VITEK 2 鉴定卡成本低。(3)步骤简单。只需经抽提、3 次离心便可进行快速鉴定,比其他预处理提取细菌蛋白方法简单快速。但此方法也有不足:(1)菌量少。血培养阳性标本中病原菌数量相对较少,无法获得足量的单一细菌用于 VITEK-MS 质谱的鉴定,导致 VITEK-MS 质谱无法鉴定或正确检出率过低,因此需尽可能地收集上层血清及沉淀,为鉴定提供更多的细菌。(2)

标本杂质多。部分血培养中的血液标本溶血,血液标本经分离胶分离后有破碎红细胞、蛋白质、碳粉等杂质,会干扰 VITEK-MS 质谱鉴定细菌,对 VITEK-MS 质谱直接鉴定细菌造成一定的难度,故需对 EP 管中的沉淀进行 1~2 次洗涤,尽可能地打破碎红细胞、蛋白质、碳粉等杂质去除,但洗涤次数不宜过多,这样会造成沉淀物中的细菌丢失,从而影响标本中的菌量。

本实验研究结果提示临床标本应在报阳后的 12 h 内即当天完成检测,确保细菌有足够的活力和浓度。本次实验在 50 例革兰阴性菌中,大肠埃希菌检出率低,有鉴定不出(42.0%)及鉴定错误(2.0%)的结果,这可能与血培养瓶中菌量较少或报阳后超过一定时间才处理有关。而肺炎克雷伯菌的鉴定效果差,可能与荚膜有关。陈峰等^[7]的研究表明 VITEK-MS 可以直接鉴定血培养阳性的标本,但亦存在革兰阳性细菌的鉴定率比革兰阴性细菌低;荚膜细菌如肺炎链球菌、流感嗜血杆菌和肺炎克雷伯菌的鉴定率比其他无荚膜细菌低;细菌量不足或混合感染时鉴定率低;培养物其他成分严重影响结果分析等问题。由于本研究只收集了革兰阴性菌进行检测,而且样本量较少,结果容易出现偏差。有待进一步加大样本量检测,获得更多的数据结果。

现阶段利用分离胶联合 VITEK-MS 直接对报阳的血培养标本进行鉴定还存在的问题,比如革兰阳性菌、真菌的检测阳性率和符合率如何,比如检出率不高,对混合菌鉴定能力不足等。但本实验方法操作简单、快速,把传统分纯培养鉴定时间由 24~48 h 大大缩短到 2 h 内,为患者进行早期、有效的治疗提供的捷径,减少患者病死率,且成本低^[8],实用性强,适合在临床微生物实验室中推广应用。

参考文献

[1] Du Z, Yang R, Guo Z, et al. Identification of staphylococ-

(上接第 2070 页)

引入荧光探针等报告分子,简化检测流程;(3)采用了生物素-链酶亲和素系统提高检测灵敏度。总之,SPR 生物传感器结合 PCR 扩增展现了一个新的分子检测工具,可以高通量特异性检测呼吸道病毒,提高疾病的临床诊断敏感性,从而有效控制呼吸道病毒的感染和治疗的效果。

参考文献

[1] 吴茜,倪林仙,李杨芳,等.急性下呼吸道感染患儿病毒病原学分析[J].中国实用儿科杂志,2007,22(12):938-939.
[2] 张雪清,胡骏,宁小晓,等.2425 例小儿呼吸道感染 7 种常见病毒检出情况分析[J].检验医学,2013,28(7):602-605.
[3] 张蓉芳.急性呼吸道感染患儿呼吸道病毒分子流行病学和临床特征的研究[D].兰州:兰州大学,2011.
[4] Caygill RL, Blair GE, Millner PA. A review on viral biosensors to detect human pathogens[J]. Anal Chim Acta, 2010, 681(1/2):8-15.
[5] Kievits T, Van Gemen B, Van Strijp D, et al. NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection[J]. J Virol Methods, 1991, 35(3):273-286.
[6] Gouvea V, Hoke CH, Innis BL. Genotyping of hepatitis E virus in clinical specimens by restriction endonuclease a-

cus aureus and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2002, 74(21):5487-5491.
[2] 邓间开,江凌晓,车小燕.基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在微生物检测中的应用进展[J].广东医学,2014,35(6):957-960.
[3] Fothergil 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 MALDI-TOF mass spectrum analysis with SARAMIS database[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(3):805-809.
[4] 陈欢欢,文怡,刘根焰,等.血培养阳性标本直接细菌鉴定和药敏中应用分离胶试管的方法探讨[J].实用临床医药杂志,2011,15(15):156-157.
[5] 赵立飞,徐建华,解传芬,等.临床应用分离胶采血管需注意的问题[J].临床检验杂志,2012,30(7):543-545.
[6] Chen JH, Ho PL, Kwan GS, et al. Direct bacterial identification in positive blood cultures by use of two commercial matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(6):1733-1739.
[7] 陈峰,李媛睿,黄甫昱婵,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.

(收稿日期:2016-05-27 修回日期:2016-06-17)

nalysiss[J]. J Virol Methods, 1998, 70(1):71-78.
[7] 廖冰洁,周迎春,李翠,等.呼吸道病原体 IgM 抗体联合检测在呼吸道感染诊断中的应用[J].国际检验医学杂志,2014,35(10):1339-1340.
[8] Boon AC, French AM, Fleming DM, et al. Detection of influenza A subtypes in community-based surveillance[J]. J Med Virol, 2001, 65(1):163-170.
[9] 姚亚萍,徐冉行,吕棠山.呼吸道病原体多重实时荧光定量 PCR 的检测[J].中华医院感染学杂志,2010,20(4):592-594.
[10] 方健,王静宇,宋海燕,等.15 种呼吸道病原体的实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J].解放军医学杂志,2010,35(10):1254-1257.
[11] 孙秋香,史蕾,顾大勇.SPR 传感技术在呼吸道病毒检测中的应用[J].中国卫生检验杂志,2012,22(2):406-408.
[12] Liu X, Song D, Zhang Q, et al. An optical surface plasmon resonance biosensor for determination of tetanus toxin[J]. Talanta, 2004, 62(4):773-779.
[13] Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, et al. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology[J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(4):559-570.

(收稿日期:2016-01-20 修回日期:2016-05-05)