·论　著·

Clin-TOF-Ⅱ MS 联合配套预处理试剂盒快速鉴定血培养阳性病原菌的研究*

姚冰洁[1]，肖晓光[1]，傅　容[2]，郭　伟[3△]

（大连医科大学附属第一医院：1. 检验科；2. 医疗保险部；3. 院内感染办公室，辽宁大连 116011）

摘　要：目的　使用临床基质辅助激光解析电离飞行时间质谱系统（Clin-TOF-Ⅱ MS）联合配套预处理试剂盒直接检测血培养阳性报警瓶中的病原菌并评估该方法的鉴定符合率。**方法**　收集大连医科大学附属第一医院 2019 年 1—5 月的血培养阳性报警标本 254 例，在转种培养的同时，抽取报警瓶中的液体并使用血培养预处理试剂盒富集、纯化报警瓶中的菌体，采用 Clin-TOF-Ⅱ MS 对待测病原菌进行直接鉴定，并将直接鉴定结果与转种培养后的菌落鉴定结果进行比较。**结果**　254 例血培养阳性报警瓶中，237 例为单一菌感染标本，17 例为混合菌感染标本。与菌落鉴定结果相比，单一菌感染标本中 Clin-TOF-Ⅱ MS 直接检测鉴定的符合率为 86.5%（205/237），其中革兰阳性菌的符合率为 81.0%（94/116），革兰阴性菌的符合率为 93.9%（108/115）；17 例混合菌感染标本鉴定的符合率为 17.6%（3/17），有 3 例未鉴定出结果，其余 11 例混合菌感染均鉴定出其中一种细菌。**结论**　Clin-TOF-Ⅱ MS 联合配套预处理试剂盒直接检测血培养阳性报警瓶中病原菌，可缩短病原菌的鉴定时间，且与传统菌落鉴定方法比有较高的鉴定符合率，适合在临床微生物实验室推广应用。

关键词：临床基质辅助激光解析电离飞行时间质谱系统；　血培养；　直接鉴定

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2020.20.005　　**中图法分类号：**R446.5

文章编号：1673-4130(2020)20-2454-04　　**文献标识码：**A

Direct identification of microorganisms from blood culture bottles by Clin-TOF-Ⅱ MS combined with blood culture pretreatment kit*

YAO Bingjie[1], *XIAO Xiaoguang*[1], *FU Rong*[2], *GUO Wei*[3△]

(1. *Department of Clinical Laboratory*; 2. *Department of Medical Insurance Management*; 3. *Office of Hospital Infection Control*, *The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University*, *Dalian*, *Liaoning* 116011, *China*)

Abstract: Objective　To evaluate the consistency rates of identifying the microorganisms directly from positive blood culture bottles by Clin-TOF-Ⅱ MS combined with blood culture pretreatment kit. **Methods**　A total of 254 positive blood culture bottles were collected from the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University during January to May 2019. Positive cultures were sub-cultured on to routing plates, and at the same time, the microorganisms were enriched and purified by blood culture pretreatment kit. Clin-TOF-Ⅱ MS was applied to identify the microorganisms and the results were compared with conventional bacterial culture. **Results**　The 254 positive culture specimens included 237 of single bacterial infection specimens and 17 multiple bacterial infection specimens. Compared with traditional identification results, the consistency rates of Clin-TOF-Ⅱ MS combined with blood culture pretreatment kit in single bacterial infection identification were 86.5% (205/237), which of Gram-negative bacteria was 93.9% (108/115) and Gram-positive bacteria was 81.0% (94/116) respectively. And totally 17.6% (3/17) of multiple bacterial infections were identified, 3 of 17 multiple bacterial infection specimens were not identified, and the remaining 11 multiple bacterial infection specimens were identified one of the bacteria. **Conclusion**　The identification time of microorganisms in positive blood culture bottles can be shortened by Clin-TOF-Ⅱ MS combined with blood culture pretreatment kit. Compared with the traditional identification, it has higher consistency rate, and recommended for clinical microbiology laboratories.

* **基金项目：**辽宁省自然科学基金指导计划项目（20180550174）。

作者简介：姚冰洁，女，主管技师，主要从事临床微生物研究。　△ **通信作者**，E-mail：guowei36@sina.com。

本文引用格式：姚冰洁，肖晓光，傅容，等. Clin-TOF-Ⅱ MS 联合配套预处理试剂盒快速鉴定血培养阳性病原菌的研究[J]. 国际检验医学杂志，2020，41(20)：2454-2457.

Key words:clinical matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry;　blood culture;　direct identification

血液、中枢神经系统、腹膜等无菌部位的感染患者病死率较高,预后差[1-4]。其中,血流感染的病死率为 30%～50%[3],及时、合理地使用抗菌药物对病原菌进行针对性的治疗对改善患者预后具有重要的作用。目前,传统培养法仍然是诊断血流感染的“金标准”,然而该方法耗时长,从血培养瓶报警到得到最终的鉴定结果需要 16～48 h。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)能直接检测血培养阳性报警瓶中的病原菌,具有快速、准确等优点,已成为国内外研究的一大热点。与传统培养法比较,MALDI-TOF MS 直接鉴定血培养阳性报警瓶中病原菌有利于感染患者得到更早、更有效的治疗[5]。

临床基质辅助激光解析电离飞行时间质谱系统(Clin-TOF-Ⅱ MS)是我国自主研发的质谱仪,已通过国家食品药品监督管理局(SFDA)、美国食品药品监督管理局(FDA)认证,可用于临床病原微生物的鉴定[6-7],已报道的血培养阳性报警瓶的前处理方法有很多,且阳性报警瓶的前处理过程对鉴定结果的准确性至关重要[8-9]。本研究采用 Clin-TOF-Ⅱ MS 联合配套预处理试剂盒(中国毅新博创)直接检测血培养阳性报警瓶中的病原菌,并对其鉴定符合率进行评估,以期为今后临床使用提供一定参考。

1　资料与方法

1.1　一般资料　收集 2019 年 1—5 月本院血培养阳性报警标本 254 例(包括外周血标本 156 例,其他体液标本 98 例),其中单一菌感染标本 237 例,混合菌感染标本(分离≥2 种菌)17 例。

1.2　仪器与试剂　血培养预处理试剂盒(中国毅新博创公司),飞行时间质谱微生物标本处理试剂盒(中国毅新博创公司),BACTEC FX 全自动血培养仪(美国 BD 公司),高速离心机(美国 Thermo 公司),Clin-TOF-Ⅱ MS(中国毅新博创公司),MicroScan® WalkAway 96 Plus 全自动细菌鉴定/药敏分析仪(德国贝克曼库尔特公司),BACTEC™ 血培养树脂需氧瓶、含溶血素厌氧瓶(美国 BD 公司),API 细菌鉴定系统(法国 bioMerieux 公司)。

1.3　方法

1.3.1　血培养阳性报警瓶中病原菌的富集与提纯　使用飞行时间质谱微生物标本处理试剂盒富集与提纯血培养阳性报警瓶中的病原菌(裂解法)。第 1 步:从血培养阳性报警瓶中抽取标本 200 μL 转移到 Eppendorf 离心管,然后加入 40 μL 组分Ⅰ混匀,室温放置 8 min;第 2 步:加入组分Ⅱ1 000 μL 混匀后 300×g 离心 3 min,取上清液转移至新的 1.5 mL Eppendorf 离心管中,13 000×g 离心 3 min 沉淀细菌,弃上清液,然后再加入 1 000 μL 组分Ⅱ,洗涤后,13 000×g 离心 3 min,彻底去除上清液;第 3 步:加入 40 μL 组分Ⅲ,涡旋振荡 30 s,静置 5 min 后,13 000×g 离心 1 min 后备用。

1.3.2　血培养阳性报警瓶中病原菌的 Clin-TOF-Ⅱ MS 直接鉴定　取 2 μL 处理后菌液点样至靶板的孔位上,室温干燥后覆盖 2 μL 基质液于样品上,室温干燥后使用 Clin-TOF-Ⅱ MS 进行检测,采集蛋白质指纹图谱,运用软件进行数据分析和比对,进行结果鉴定。根据产品说明,鉴定结果以置信度分数来判读:置信度≥25 分,表示结果可信;置信度为 20～<25 分,表示该置信度下的鉴定结果需通过其他试验或者根据经验来选出最终鉴定结果;置信度<20 分,表示该置信度下的鉴定结果不可靠。鉴定软件中每个数据会产生 10 个鉴定结果,以置信度分数最高且排名第一结果为准。

1.3.3　血培养阳性报警瓶中病原菌的菌落鉴定　血培养瓶阳性报警后,涂片革兰染色并且转种培养,培养 24～48 h 后,挑取纯菌落分别使用 Clin-TOF-Ⅱ MS 和 MicroScan® WalkAway 96 Plus 全自动细菌鉴定/药敏分析仪进行鉴定,若疑似为厌氧菌时,使用 API 细菌鉴定系统进行鉴定。当两种仪器鉴定结果不一致时采用 API 细菌鉴定系统进行确认。

1.4　统计学处理　使用 SPSS22.0 软件进行统计学分析。血培养阳性报警瓶 Clin-TOF-Ⅱ MS 直接鉴定与菌落鉴定的鉴定分值的比较使用秩和检验(Mann-Whitney 检验),以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　血培养阳性报警瓶单一菌感染标本 Clin-TOF-Ⅱ MS 直接鉴定结果　在 237 个单一菌感染标本中,Clin-TOF-Ⅱ MS 直接鉴定结果与菌落鉴定结果的符合率为 86.5%(205/237),其中革兰阳性菌的符合率为 81.0%(94/116),革兰阴性菌的符合率为 93.9%(108/115)。具体结果见表 1。

表 1　单一菌感染标本 Clin-TOF-Ⅱ MS 直接鉴定结果

细菌	n	未鉴定出(n)	鉴定错误(n)	符合例数(n)	符合率(%)
革兰阴性菌	115	6	1	108	93.9
肠杆菌科	77	2	1	74	96.1
大肠埃希菌	35	1	0	34	97.1
肺炎克雷伯菌	31	1	0	30	96.8
产酸克雷伯菌	2	0	0	2	100.0
产气肠杆菌	3	0	1	2	66.7
阴沟肠杆菌种复合体	3	0	0	3	100.0
奇异变形杆菌	2	0	0	2	100.0
弗劳地枸橼酸杆菌	1	0	0	1	100.0

续表 1　单一菌感染标本 Clin-TOF-Ⅱ MS 直接鉴定结果

细菌	n	未鉴定出（n）	鉴定错误（n）	符合例数（n）	符合率（%）
非发酵菌	35	4	0	31	88.6
铜绿假单胞菌	18	2	0	16	88.9
鲍曼不动杆菌种复合体	10	1	0	9	90.0
皮氏罗尔斯顿菌	2	0	0	2	100.0
洋葱伯克霍尔德菌	3	1	0	2	66.7
嗜麦芽窄食单胞菌	2	0	0	2	100.0
革兰阴性厌氧菌	3	0	0	3	100.0
脆弱拟杆菌	2	0	0	2	100.0
小韦荣球菌	1	0	0	1	100.0
革兰阳性菌	116	14	8	94	81.0
葡萄球菌属	55	3	5	47	85.5
金黄色葡萄球菌	13	0	1	12	92.3
表皮葡萄球菌	22	0	2	20	90.9
溶血葡萄球菌	7	0	1	6	85.7
人葡萄球菌	3	0	1	2	66.7
头状葡萄球菌	2	0	0	2	100.0
木糖葡萄球菌	4	1	0	3	75.0
里昂葡萄球菌	1	0	0	1	100.0
沃氏葡萄球菌	1	1	0	0	0.0
巴氏葡萄球菌	2	1	0	1	50.0
肠球菌属	41	3	1	37	90.2
屎肠球菌	19	1	1	17	89.5
粪肠球菌	22	2	0	20	90.9
链球菌属	15	4	2	9	60.0
缓症链球菌	2	1	1	0	0.0
停乳链球菌	4	0	0	4	100.0
咽峡炎链球菌	3	2	1	0	0.0
嵴链球菌	2	1	0	1	50.0
无乳链球菌	4	0	0	4	100.0
革兰阳性厌氧菌	1	0	0	1	100.0
痤疮丙酸杆菌	1	0	0	1	100.0
革兰阳性杆菌	4	4	0	0	0.0
纹带棒状杆菌	2	2	0	0	0.0
杰氏棒状杆菌	2	2	0	0	0.0
念珠菌属	6	2	1	3	50.0
近平滑假丝酵母菌	4	1	1	2	50.0
白色假丝酵母菌	1	0	0	1	100.0
热带假丝酵母菌	1	1	0	0	0.0
合计	237	22	10	205	0.8

2.2　血培养阳性报警瓶 Clin-TOF-Ⅱ MS 直接鉴定与菌落鉴定的鉴定分值　血培养阳性报警瓶内细菌富集后使用 Clin-TOF-Ⅱ MS 进行直接鉴定，鉴定分值的 P_{25}、P_{50} 和 P_{75} 为 27、40 和 60。将血培养阳性瓶转种于血和巧克力平板或厌氧平板，恒温箱孵育，培养 24～48 h 后，挑取纯菌落使用 Clin-TOF-Ⅱ MS 鉴定，鉴定分值的 P_{25}、P_{50} 和 P_{75} 为 46、65 和 87。研究结果表明，转种培养后菌落鉴定的鉴定分值要高于直接鉴定，差异有统计学意义（$Z=-8.571$，$P<0.001$）。

2.3　混合菌感染标本 Clin-TOF-Ⅱ MS 直接鉴定结果　17 例混合菌感染标本鉴定的符合率为 17.6%（3/17），有 3 例未鉴定出结果，其余 11 例混合菌感染标本均鉴定出其中一种结果。见表 2。

表 2　混合菌感染标本菌落鉴定结果及 Clin-TOF-Ⅱ MS 直接鉴定结果

菌落鉴定结果	n	Clin-TOF-Ⅱ MS 直接鉴定结果
肺炎克雷伯菌，大肠埃希菌	2	肺炎克雷伯菌，大肠埃希菌
金黄色葡萄球菌，屎肠球菌	1	金黄色葡萄球菌，屎肠球菌
肺炎克雷伯菌，大肠埃希菌，粪肠球菌	1	肺炎克雷伯菌
肺炎克雷伯菌，大肠埃希菌	4	大肠埃希菌
金黄色葡萄球菌，鲍曼不动杆菌	1	金黄色葡萄球菌
金黄色葡萄球菌，表皮葡萄球菌	1	金黄色葡萄球菌
大肠埃希菌，屎肠球菌	2	大肠埃希菌
鲍曼不动杆菌，铜绿假单胞菌	2	鲍曼不动杆菌
表皮葡萄球菌，杰氏棒状杆菌	1	未鉴出
屎肠球菌，杰氏棒状杆菌	1	未鉴出
表皮葡萄球菌，近平滑假丝酵母菌	1	未鉴出

3　讨　论

MALDI-TOF MS 直接检测血培养阳性报警瓶中病原菌能够极大地缩短病原菌的鉴定时间[10-11]。近年来，国内外很多学者都对 MALDI-TOF MS 直接检测血培养阳性报警瓶中病原菌进行了探索，目前在我国临床上推广的主要有 Biotyper MS 和 Vitek MS 两大质谱系统，而这些研究也几乎都基于这两大质谱系统，目前将国产质谱系统用于血培养阳性报警瓶中病原菌直接检测的研究较少。随着 MALDI-TOF MS 逐渐在临床广泛应用，国产设备亦受到越来越多的关注。本研究使用我国自主研发的 Clin-TOF-Ⅱ MS 联合配套预处理试剂盒直接检测血培养阳性报警瓶中病原菌，评估其鉴定符合率。

本研究使用 Clin-TOF-Ⅱ MS 联合配套预处理试剂盒对单一菌感染标本的鉴定符合率较高，其中革兰阴性菌的鉴定符合率为 93.9%（108/115），革兰阳性菌的符合率为 81.0%（94/116），临床常见的革兰阴性菌、葡萄球菌属、肠球菌属的鉴定符合率均可达 85% 以上。李媛睿等[12]应用 MALDI Sepsityper™ Kit 联合 Microflex™ LT 型质谱仪直接鉴定血培养标本，结果显示单种菌中革兰阴性菌的种、属水平符合率分别为 75.4%（132/175）、77.7%（136/175），革兰阳性菌的种、属水平符合率分别为 70.9%（178/251）、74.9%（188/251）。段达荣等[13]使用 VITEK MS 质谱仪直接对血培养阳性标本细菌进行鉴定，结果显示单种菌

中革兰阴性菌的种、属水平符合率分别为 80.3%(114/142)、70.9%(83/117)。本研究结果提示,Clin-TOF-Ⅱ MS 联合配套预处理试剂盒对阳性血培养报警瓶中病原菌的鉴定能力并不低于上述两大质谱系统。

有文献表明,MALDI-TOF MS 对链球菌属、革兰阳性杆菌、念珠菌属及一些少见菌的鉴定符合率不高[14-15],这与本研究结果一致。这可能由以下原因导致:(1)由于革兰阳性菌细胞壁结构相对较厚,不易裂解,或者由于细菌生长缓慢,菌体形态较小等,导致提取的核糖体蛋白浓度不够;(2)核糖体蛋白高度相似,特征性峰谱较少,质谱难以区分,比如肺炎链球菌、缓症链球菌和唾液链球菌等[16];(3)某些标本中红细胞和白细胞的数量过多,使得在预处理过程中细胞裂解不充分,干扰了鉴定结果[12]。除此以外,Clin-TOF-Ⅱ MS 本身的数据库并不完善也是影响其鉴定符合率的因素之一,可以通过不断完善数据库以及建立自建库等方法来提高其符合率。研究发现,Clin-TOF-Ⅱ MS 直接鉴定血培养阳性报警瓶中病原菌的鉴定分值低于菌落鉴定结果,这可能是因为直接鉴定时血红蛋白的水平较高,在质谱检测时会产生强烈的信号及峰值从而对目的菌株的鉴定形成干扰[12]。

研究中还有 17 例混合菌感染标本,Clin-TOF-Ⅱ MS 联合配套预处理试剂盒直接鉴定的符合率仅为 17.6%(3/17),有 3 例未鉴定出结果,其余 11 例混合菌感染标本均鉴定出其中一种结果。这说明虽然该方法具有简便、准确、快速等优点,但仍不能完全取代传统的培养法,因此,当血培养阳性报警瓶病原菌经过涂片、革兰染色确定为混合菌时,则应转种培养分纯后再进行鉴定,以免漏检阳性标本。

4 结　论

综上所述,与传统的菌落鉴定方法相比,使用 Clin-TOF-Ⅱ MS 联合配套预处理试剂盒检测血培养阳性报警瓶中的病原菌符合率较高,且可缩短鉴定时间,适合在临床微生物室推广应用。

参考文献

[1] TIAN Y,ZHENG B,WANG B,et al. Rapid Identification and Multiple Susceptibility Testing of Pathogens from Positive-Culture Sterile Body Fluids by a Combined MALDI-TOF Mass Spectrometry and Vitek Susceptibility System[J]. Front Microbiol,2016,20(7):523-528.

[2] CHON Y E,KIM S U,LEE C K,et al. Community-acquired vs. nosocomial spontaneous bacterial peritonitis in patients with liver cirrhosis[J]. Hepatogastroenterology,2014,61(136):2283-2290.

[3] ZHU S,KANG Y,WANG W,et al. The clinical impacts and risk factors for non-central line-associated bloodstream infection in 5 046 intensive care unit patients:an observational study based on electronic medical records[J]. Crit Care,2019,23(1):52-56.

[4] GAO J,LI H,TORAB P,et al. Nanotube assisted microwave electroporation for single cell pathogen identification and antimicrobial susceptibility testing[J]. Nanomedicine,2019,17:246-253.

[5] MORGENTHALER N G,KOSTRZEWA M. Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis:review and meta-analysis of the performance of the sepsityper kit[J]. Inter J Microbiol,2015,2015:827416-827421.

[6] 范欣,肖盟,徐志鹏,等. 国产基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱系统 Clin-TOF-Ⅱ MS 与 Bruker Biotyper 质谱系统在革兰阴性菌的鉴定效能评估[J]. 中华检验医学杂志,2017,40(1):41-45.

[7] 马继华,黄洪,沈凌炜,等. Clin-TOF 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱在临床病原菌鉴定中的应用评价[J]. 中华急诊医学杂志,2018,27(2):215-220.

[8] 胡继红,马筱玲,王辉,等. MALDI-TOF MS 在临床微生物鉴定中的标准化操作专家共识[J]. 中华检验医学杂志,2019,42(4):241-249.

[9] 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.

[10] YUAN Y,WANG J,ZHANG J,et al. Evaluation of an optimized method to directly identify bacteria from positive blood cultures using MALDI-TOF mass spectrometry[J]. J Clin Lab Anal,2019,13:e23119.

[11] TSUCHIDA S,MURATA S,MIYABE A,et al. An in-house centrifugation and membrane filtration technique for identifying microorganisms from positive blood culture bottles with high identification rates using matrix-assisted laser desorption ionization-Time-of-flight mass spectrometry:a preliminary report[J]. J Infect Chemother,2020,26(3):266-271.

[12] 李媛睿,俞静,刘婧娴,等. 应用 MSK 试剂盒-质谱法直接鉴定阳性血培养标本[J]. 上海交通大学学报,2016,36(2):256-263.

[13] 段达荣,蔡莎莎,朱晔晶,等. VITEK2Compact 鉴定仪和 VITEK MS 质谱仪直接对血培养阳性标本细菌进行鉴定的探讨[J]. 中国卫生检验杂志,2018,28(4):426-428.

[14] 秦娟秀,黄芊,高倩倩,等. MALDI Sepsityper™ Kit 和血清分离胶促凝管法两种前处理方法在基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术直接鉴定阳性血培养病原菌的应用评估[J]. 中国感染与化疗杂志,2017,17(5):546-551.

[15] 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.

[16] 顾丹霞,余涛,张晓飞,等. MALDI Biotyper 和 VITEK MS 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱对链球菌鉴定的比较研究[J]. 中华检验医学杂志,2015,38(2):98-101.

(收稿日期:2020-03-12　修回日期:2020-06-25)