

MALDI-TOF 质谱仪在临床常见细菌鉴定中的应用*

王 冰,任晓庆,褚美玲,杨 柳,盛翔宇,周连庆,薛文成,孟冬娅[△]

(沈阳军区总医院检验科,辽宁沈阳 110016)

摘 要:目的 探讨两种质谱仪 Biotyper MS 和 Vitek-MS 系统在临床常规分离细菌鉴定中的应用价值。方法 收集沈阳军区总医院 2012 年 3 月至 2013 年 1 月分离自血液、尿液、脑脊液、分泌物和痰液等标本的临床常见菌细菌 149 株(包括 14 个菌属和 30 个菌种)。同时采用两种 MALDI-TOF-MS 系统对上述菌株进行鉴定,结果与 Vitek2 compact 常规生化鉴定进行比较,对 3 种方法检测结果不一致菌株用 16S rRNA 测序进行确认。结果 在 149 株常见细菌中,Bruker Biotyper 属和种的正确鉴定率分别为 98%和 96%,Vitek-MS 属和种的正确鉴定率分别为 97%和 95%。两者均无错误鉴定菌株。结论 对该组常见细菌,两种质谱仪鉴定结果比较差异无统计学意义($P>0.05$),均呈现出优异的鉴定水平,适合用于临床微生物的常规鉴定。

关键词:细菌; 质谱分析; 16S rRNA

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.16.047

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)16-2228-03

Application of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometer in
identification of clinical common bacteria*

Wang Bing, Ren Xiaoqing, Chu Meiling, Yang Liu, Sheng Xiangyu, Zhou Lianqing, Xue Wencheng, Meng Dongya[△]

(Department of Clinical Laboratory, General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang, Liaoning 110016, China)

Abstract: Objective To evaluated the application value of two kinds of mass spectrometer(MS) and Vitek MS system in the identification of routinely isolated bacteria in clinic. **Methods** 149 strains of common bacteria(including 14 genera and 30 species) isolated from blood, urine, cerebral spinal fluid, secretion and sputum samples in our hospital from March 2012 to January 2013 were collected and simultaneously identified by 2 kinds of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometer (MALD-TOF-MS). The identification results were compared with those identified by the conventional biochemical identification (Vitek2 compact). The strains with the inconsistent results identified by 3 kinds of method were confirmed by 16S rDNA gene sequencing. **Results** Among 149 common bacteria, the correct identification rates of genus and species by the Bruker Biotyper MS were 98% and 96% respectively and which by the Vitek MS system were 97% and 95% respectively. There were no misidentified bacterial strains by these two kinds of MS. **Conclusion** No statistical difference in the identification results was observed between these two kinds of MS system($P>0.05$). Both exhibit excellent identification level and are suitable for the routine laboratory identification of clinical microorganism.

Key words: bacteria; mass spectrographic analysis; 16S rRNA

对临床分离细菌进行快速鉴定是临床医生和检验科的共同愿望,分子生物学鉴定方法快速准确,如荧光杂交和 PCR^[1],但成本昂贵且费时,不适合于常规大量样本的鉴定。实验室急需开展一种简单快速高效益的常规微生物鉴定方法。本研究旨在评估质谱分析仪-BioTyper 和 Vitek MS 对临床分离常见细菌的快速鉴定效能,探讨其用于细菌室日常工作的可行性。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集沈阳军区总医院 2012 年 3 月至 2013 年 1 月临床分离菌株 149 株(代表 14 个菌属,30 个菌种)。菌株来源如下:血液 59 例、痰液 42 例、尿液 26 例、分泌物 12 例、脓汁 2 例、脑脊液 3 例、骨髓 2 例、导管 1 例、穿刺液 1 例和胃液 1 例。

1.2 仪器与试剂 MALDI-TOF VITEK-MS 系统(法国 BioMrieux 公司),MALDI-TOF Bruker BioTyper 系统(德国 Bruker 公司),VITEK2 COMPACT 自动鉴定仪及 GN、GP、NH 和 ANC 细菌鉴定卡(法国 BioM6rieux 公司),基因组

DNA 小量提取试剂盒(MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction kit II)及 PCR 反应相关试剂(TakaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit),大连宝生物公司,Roche480 II 实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细菌分离培养 所有菌株标本接种在相应培养基上(5%羊血琼脂或巧克力培养基),35℃孵育箱恒温培养 24~48 h(生长条件有特殊要求的菌置于 5%~10% CO₂ 培养箱或厌氧袋中)。

1.3.2 细菌的生化鉴定 采用 VITEK2 COMPACT 自动鉴定仪及配套鉴定卡,严格按照说明书进行操作。

1.3.3 16S rRNA 检测及测序 DNA 提取试剂盒提取模板 DNA,进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增,产物送大连宝生物有限公司测序部完成;结果在 GenBank 数据库中进行比对。

1.3.4 细菌的 MALDI-TOF MS 鉴定 用无菌接种环挑取适量(3~5 个)纯培养单个落菌涂于质谱仪样品检测板上,迅速加 0.5 μL 的 70%甲酸覆盖加样的位置,随后再点 1 μL α-氰

基-4-羟基肉桂酸(HCCA)溶液覆盖。室温放置,待基质液干燥后,将检测板放入质谱仪检测。Bruker MicroFlex LT 系统以线性正性模式,用最大频率(20~200 Hz)采集相对分子质量(2~20)×10³的图谱,BioTyper 软件对所采集的图谱进行分析。Vitek MS 系统以线性正性模式,用 50 Hz 频率采集相对分子质量(2~20)×10³的图谱,并采用 ASC 运算法对所得图谱进行分析。根据所得图谱与数据库参考图谱匹配程度,BioTyper 软件匹配模式可得到从 0 到 100 的分值(对数值 1~3),VITEK-MS 系统可得到从 0%到 99.9%的匹配百分率。质控菌株大肠埃希 ATCC8739 接种到每一组的校准靶点。根据质谱仪鉴定分值,Bruker≥1.7 或 Vitek≥70%时,结果高度可信;Bruker<1.7 或 Vitek<70%时,认为其无法提供鉴定结果。

1.3.5 鉴定结果的判读 质谱鉴定结果分类如下:(1)正确鉴定到属,即质谱分析的图谱与参考菌株的图谱在属水平上一致;(2)正确鉴定到种,质谱分析的图谱与参考菌株的图谱在种

的水平上完全一致;(3)无鉴定结果,在数据库中未找到匹配的参考菌株图谱。以 VITEK2 或 16S rRNA 基因测序作为参考方法。当 BioTyper,Vitek-MS 和 VITEK2 三者鉴定结果一致时,认为质谱鉴定结果正确;当 BioTyper,Vitek-MS 和 VITEK2 三者鉴定结果不完全一致时,以 16S rRNA 基因测序为标准。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计数配对“二分类”资料采用 McNemar's 检验。检验水准 α≤0.05,有统计学意义。

2 结 果

2.1 常见菌鉴定结果分析 149 株常见菌包括 83 株革兰阴性细菌和 66 株革兰阳性细菌。BioTyper 和 Vitek-MS 属的正确鉴定率分别为 98%和 97%,种的正确鉴定率分别为 96%和 95%;两者对本组菌的正确鉴定率比较,差异无统计学意义(P>0.05)。BioTyper 和 Vitek-MS 无鉴定结果的菌株分别为 3 株和 5 株。两者均无错误鉴定菌株。结果见表 1。

表 1 Bruke Biotyper 和 Vitek-MS 常见菌鉴定结果[n(%)]

参考菌株	n	Bruke Biotyper			VITEK-MS		
		正确鉴定		无鉴定结果	正确鉴定		无鉴定结果
		属水平	种水平		属水平	种水平	
革兰阴性细菌	83	82(99)	80(96)	1(0.67)	81(98)	78(94)	2(1.34)
革兰阳性细菌	66	64(97)	63(95)	2(1.34)	63(95)	63(95)	3(2.00)
合计	149	146(98)	143(96)	3(2.00)	144(97)	141(95)	5(3.40)

2.2 83 株革兰阴性细菌鉴定结果 BioTyper 属和种的正确鉴定率分别为 99%和 96%,Vitek-MS 属和种的正确鉴定率分别为 98%和 94%。两者对革兰阴性细菌的正确鉴定率比较差异无统计学意义(P>0.05)。种水平上鉴定错误但属水平上鉴定正确的革兰阴性杆菌菌株,BioTyper 为 2 株,分别为乙酸钙不动杆菌和 Libanensis/荧光假单胞菌;Vitek-MS 为 3 株,分别为 2 株阴沟肠杆菌和 1 株乙酸钙不动杆菌。首次检测中,BioTyper 无鉴定结果的菌株为 1 株谱成沙雷菌,Vitek-MS 无鉴定结果的菌株为 1 株聚团肠杆菌和 1 株普通变形杆菌。

2.3 66 株革兰阳性细菌鉴定结果 BioTyper 属和种的正确鉴定率分别为 97%和 95%,Vitek-MS 属和种的正确鉴定率均为 95%。两者对革兰阳性细菌的正确鉴定率比较差异无统计学意义(P>0.05)。BioType 种水平鉴定错误但属水平鉴定正确的菌株为 1 株表皮葡萄球菌。BioTyper 无鉴定结果的菌为 1 株人型葡萄球菌亚种和 1 株粪肠球菌。Vitek-MS 无鉴定结果的菌株为 1 株表皮葡萄球菌和 2 株粪肠球菌。

3 讨 论

近年来,MALDI-TOF MS 作为一项新兴的临床微生物鉴定技术,在国外广受关注^[2-13],与传统生化表型和分子生物学方法相比,MALDI-TOF MS 具有简单,快速,准确和经济的特点^[2-3,5,7]。目前,一些操作简易的商业化质谱仪已经走进临床微生物实验室,具有代表性的如 Bruker Biotyper,Vitek MS 和 Andromas(Andromas SAS,France) systems。这些系统拥有不同的图谱数据库和独特的数据分析算法^[14]。国外有研究认为,质谱分析仪对某些菌的鉴定准确率(属水平)近乎 100%,如非发酵菌^[15],沙门菌^[16]等。Marko^[16]评估了 Bruker Biotyper 和 Vitek MS 系统对 200 株(约 15 个菌属,26 个菌种)

分离自囊胞纤维的非发酵革兰阴性菌的鉴定,两者种的正确鉴定率分别为 72.5%和 80%(P>0.05),Vitek MS 系统无法提供鉴定的菌株(7%)多于 Bruker Biotyper(3%)。2 种质谱仪对国内临床分离菌株的鉴定能力的对比评价,目前尚未见报道。

本研究中的 149 个临床分离菌株包括 14 个菌属和 30 个菌种。对这 149 个菌株,BioTyper 和 Vitek-MS 均表现出相似且较高的鉴定水平。Biotyper 和 Vitek MS 对 27 株非发酵革兰阴性杆菌和 38 株葡萄球菌属的正确鉴定率均为 100%。BioTyper 和 Vitek-MS 种水平鉴定错误但属水平鉴定正确的菌株均为 3 株,两者将 1 株乙酸钙不动杆菌分别鉴定为约翰不动杆菌和鲍曼不动杆菌;BioTyper 分别将 1 株 libanensis /荧光假单胞菌和 1 株表皮葡萄球菌鉴定为 beijerinckii/ gelidicola 假单胞菌和头状葡萄球菌;Vitek-MS 将 2 株阴沟肠杆菌鉴定为阴沟/阿氏肠杆菌。虽然这 6 株菌只被正确鉴定到了属,但不会影响临床的合理用药。

对首次检测错误或无结果菌株,都进行了复检。Biotyper 和 Vitek-MS 无鉴定结果的菌株分别为 3 株和 5 株;Biotyper 无法鉴定的 3 株菌经重复检测后,均得到正确鉴定;Vitek-MS 无法鉴定的 5 株菌株经重复检测后,4 株得到准确鉴定。这些现象表明:操作者水平和样品准备等质谱分析前阶段因素影响鉴定结果^[4,10,12]。其他研究报道的常见影响因素有菌株重复传代培养,样品准备方法,操作者技术问题等。故在常规工作中,首次无法鉴定的菌株需进行重复检测。

Couturier^[18]在研究中发现,质谱仪对细菌的准确鉴定率与数据库的完善与否有很大关系,并认为仪器数据库中生物个体单一的参考光谱有时并不能代表分离自其他实验室的同种

典型菌株。本实验中的 1 株聚团肠杆菌虽包含在数据库中,但在重复检测中依然没有被鉴定出来,可能是其产生的图谱与数据库中特征图谱不一致。因此,为提高 MALDI-TOF MS 对细菌的鉴定能力,仪器生产商有必要对图谱数据库逐步完善。考虑到菌株标本来源多样性、地域来源差异性和不同分离年限,每一菌种特定谱图的采集应该参考多个同种菌株。而使用者将本地分离的典型菌株作为参考菌株自主填充到开放数据库中,可能是最有效的补充,值得深入探讨。

最近,Chen^[19]报道了 Bruker Biotyper 系统和 Vitek MS IVD 采用 MALDI Sepsityper 蛋白质提取法对 181 株(代表 20 个菌属,40 个菌种)来自血培养物细菌的直接鉴定,总体上 Biotyper(97.8%)的正确鉴定水平高于 Vitek MS(92.3%)。相信随着研究内容的增多,质谱仪可在临床实际应用发挥更大作用。

参考文献

- [1] Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases[J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(4): 840-862.
- [2] van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(3): 900-907.
- [3] Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1169-1175.
- [4] Bizzini A, Durussel C, Bille J, et al. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(5): 1549-1554.
- [5] Neville SA, Lecordier A, Ziochos H, et al. Utility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry following introduction for routine laboratory bacterial identification[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(8): 2980-2984.
- [6] Dubois D, Grare M, Prere MF, et al. Performances of the vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(8): 2568-2576.
- [7] Tan EK, Ellis BC, Lee R, et al. Prospective evaluation of a MALDI-TOF MS system in a hospital clinical microbiology laboratory for the identification of bacteria and yeasts; a bench-by-bench study to assess the impact on time-to-identification (TTI) and cost-effectiveness[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(10): 3301-3308.
- [8] Fothergill 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 matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum analysis with the SARAMIS database[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(3): 805-809.
- [9] Khot D, Couturier R, Wilson A, et al. Optimization of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis for bacterial identification[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(5): 3845-3852.
- [10] TeKippe ME, Shuey S, Winkler DW, et al. Optimizing Identification of clinically relevant gram-positive organisms by use of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(5): 1421-1427.
- [11] Farfour E, Leto J, Barritault M, et al. Evaluation of the andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing gram-positive bacilli[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(8): 2702-2707.
- [12] Ford A, Burnham D. Optimization of Routine Identification of clinically relevant gram-negative bacteria by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and the Bruker Biotyper[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(5): 1412-1420.
- [13] Schulthess B, Brodner K, Bloemberg V, et al. Identification of gram-positive cocci by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostics[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(6): 1834-1840.
- [14] Emonet S, Shah HN, Cherkaoui A, et al. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology[J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(11): 1604-1613.
- [15] Mellmann A, Cloud J, Maier T, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(6): 1946-1954.
- [16] Dieckmann R, Helmuth R, Erhard M, et al. Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(24): 7767-7778.
- [17] Marko C. Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(6): 2034-2039.
- [18] Couturier MR, Mehinovic E, Croft C, et al. Identification of HACEK clinical isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(3): 1104-1106.
- [19] Chen HK. 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.

(收稿日期: 2014-03-05)