

MALDI-TOF MS 用于临床微生物检验中常见菌鉴定的应用探讨*

张丽丽, 周守瑜, 陈世鹏, 乔 森[△]

(遵义医学院医学检验系, 贵州遵义 563000)

摘要:目的 通过比较两种微生物鉴定系统基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)和 Vitek 2 Compact, 评价 MALDI-TOF MS 在临床常规分离微生物中的应用价值。方法 对比 MALDI-TOF MS 和 Vitek 2 Compact 系统的菌种数据库, 筛选出 MALDI-TOF MS 菌库中新增菌种, 统计该院自 2015 年 5 月 MALDI-TOF MS 投入使用起至 2016 年 12 月新增菌种被检出的菌株及频次, 以及高置信度鉴定临床常见致病菌的检出频次。结果 MALDI-TOF MS 较 Vitek 2 Compact 菌库中新增 205 种菌株, 在 2015 年 5 月至 2016 年 12 月临床微生物检验中共检出 206 次, 且 MALDI-TOF MS 系统高置信度鉴定 4 种临床常见致病菌共 286 例。结论 MALDI-TOF MS 菌种数据库更大、准确度高, 更能满足临床微生物检验的需求, 适于更广泛地投入到临床微生物鉴定的应用中。

关键词:基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 微生物鉴定; 分离鉴定**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.05.006**中图法分类号:**R-331; R446.5**文章编号:**1673-4130(2018)05-0534-04**文献标识码:**A

Application of MALDI-TOF MS for identification of common bacteria in clinical microbiological test*

ZHANG Lili, ZHOU Shouyu, CHEN Shipeng, QIAO Sen[△]

(Department of Clinical Laboratory, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the application value of MALDI-TOF MS system in clinical routine separation microorganism by comparing two kinds of microorganism identification system MALDI-TOF MS and Vitek 2 Compact. **Methods** The bacterial species database of MALDI-TOF MS system and the Vitek 2 Compact system were compared, the new strains from MALDI-TOF MS library were screened out, and the number and frequency of new strains detected from May 2015 when MALDI-TOF MS was put in use to December 2016, and the frequency of detection of common pathogenic bacteria with high confidence were counted. **Results** There were 205 more new strains in the MALDI-TOF MS library, compared with Vitek 2 Compact. From May 2015 to December 2016, 206 times were detected in clinical microbiological examination, and 286 cases if 4 kinds of clinical common pathogenic bacteria were identified by MALDI-TOF MS system with high confidence. **Conclusion** MALDI-TOF MS strain database is more accurate and large, which can meet the needs of clinical microbiological examination, and is suitable for wider application in clinical microbial identification.

Key words: MALDI-TOF MS; microorganism identification; isolated microorganisms

对临床致病细菌进行快速且准确的鉴定和诊断并监测其流行情况, 及时向临床提供治疗方案和控制感染, 是临床微生物检验的首要任务。目前病原菌鉴定方法大致可以分为两个大类: 表型鉴定法和基因型鉴定法, 前者作为微生物鉴定的传统手段目前应用较为广泛。传统微生物鉴定方法主要是建立在形态学、生态学、细胞生理学和生物化学水平上, 临床以应用 Vitek 2 Compact 全自动微生物分析系统(简称 Vitek 2 Compact)最为常见, 但 Vitek 2 Compact 存在操作

相对繁琐和检测周期长等缺陷^[1]。而基因型鉴定法通过分子生物学方法将细菌的检测与鉴定引入核酸和蛋白质等大分子水平, 具有重大意义, 但同样有检测时间长、成本高、检测效率不高等缺点。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)是近年来迅速发展壮大起来的一种新型软电离质谱技术, 用于分析非挥发性生物大分子, 目前在各个领域应用广泛。尤其在菌株鉴定方面, 与 Vitek 2 Compact 相比较, MALDI-TOF MS 具有菌种对照库涵

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31560325)。

作者简介: 张丽丽, 女, 主管技师, 主要从事临床微生物及分子生物学方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: 173995724@qq.com。

本文引用格式: 张丽丽, 周守瑜, 陈世鹏, 等. MALDI-TOF MS 用于临床微生物检验中常见菌鉴定的应用探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(5): 534-536.

盖较广、准确度高、高通量、易于操作和重复性好等优点。遵义医学院附属医院临床微生物实验室于 2015 年引入 MALDI-TOF MS 全自动快速微生物质谱检测系统(法国梅里埃)。本文通过比对 MALDI-TOF MS 和 Vitek 2 Compact 系统的菌种库,筛选出 MALDI-TOF MS 菌库中新增的菌种,并统计临床微生物检验中临床样本自 2015 年 5 月 MALDI-TOF MS 投入使用起至 2016 年 12 月新增菌种被检测出的频次及 MALDI-TOF MS 快速鉴定临床常见菌的种类及数量,探讨 MALDI-TOF MS 在常见菌鉴定方面的临床应用价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究所有样本均来自遵义医学院附属医院临床微生物实验室自 2015 年 5 月至 2016 年 12 月临床分离菌株应用 MALDI-TOF MS 的检测结果,其中同一患者重复分离出同一菌株不重复计入。

1.2 仪器与试剂 MALDI-TOF MS(法国生物梅里埃),MALDI-TOF MS(V2.0)及 Vitek 2 Compact 系统(V7.01)菌种对照库,检测靶板,基质液为 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)。

1.3 方法 按照《全国临床检验操作规程》要求进行菌株的分离培养,分别采用 MALDI-TOF MS 和 Vitek 2 Compact 系统对临床常规分离菌株进行鉴定。比对 MALDI-TOF MS 和 Vitek 2 Compact 系统的菌种库,筛选出 MALDI-TOF MS 菌种数据库较 Vitek 2 Compact 菌种数据库新增的菌种,统计遵义医学院附属医院临床微生物实验室自 2015 年 5 月 MALDI-TOF MS 投入使用起至 2016 年 12 月该新增菌种中被检出的菌株及频次,以及高置信度鉴定临床常见致病菌的检出频次,剔除同一患者重复分离的菌株。

2 结 果

2.1 新增菌种 MALDI-TOF MS 菌种对照库相对 Vitek 2 Compact 系统菌种对照库共新增了 205 种菌种,其中同属新增数量超过 5 种的菌株包括乳杆菌属、酵母菌属、分枝杆菌属、青霉菌属、放线菌属、曲霉菌属、双歧杆菌属、梭菌属、单胞菌属、葡萄球菌属、镰刀菌属,见表 1。

表 1 菌种对照库新增数量较多菌种

菌种	数量(n)
乳杆菌属	21
酵母菌属	18
分枝杆菌属	11
青霉菌属	10
放线菌属	5
曲霉菌属	8
双歧杆菌属	5
梭菌属	6

续表 1 菌种对照库新增数量较多菌种

菌种	数量(n)
单胞菌属	7
葡萄球菌属	5
镰刀菌属	5
合计	101

2.2 新增菌种检出频次 2015 年 5 月至 2016 年 12 月的临床分离菌株中新增菌种共检出 206 次,包括革兰阴性菌 78 次,革兰阳性菌 114 次,真菌类 9 次,分枝杆菌 5 次。见表 2。

表 2 新增菌种检出频次

菌种	菌株	频次(n)
革兰阴性	微黄奈瑟菌*	13
	沃克曼柠檬酸杆菌	32
	生痰二氧化碳嗜纤维菌	3
	变形肥杆菌	2
	埃氏拟杆菌	5
	维龙假单胞菌	4
	豪泽变形杆菌	1
革兰阳性	短稳杆菌*	13
	惰性乳杆菌	5
	卷曲乳杆菌	5
	布氏乳杆菌	8
	德氏乳杆菌	3
	混淆魏斯氏菌	2
	多毛棒状杆菌	15
	苏黎世放线菌	3
	龋齿放线菌	2
	龋齿罗斯菌	3
	丙酮丁醇梭菌	1
真菌	霍尔姆假丝酵母菌*	3
	诺维吉假丝酵母菌	2
	弯曲隐球菌*	3
	土生隐球菌	1
分枝杆菌	堪萨斯分枝杆菌*	3
	耻垢分枝杆菌	2
合计		206

注:* 表示致病菌或条件致病菌

2.3 较高的鉴定置信度 MALDI-TOF MS 对来自临床常见致病菌中奈瑟菌、沙门菌、肺炎链球菌、单增李斯特菌等的鉴定优于传统鉴定方法^[2],鉴定率可达到 99% 以上。遵义医学院附属医院临床微生物实验室 2015 年 5 月至 2016 年 12 月使用 MALDI-TOF MS 鉴定以上致病菌的频次为肺炎链球菌 154 次,沙门菌群 65 次,淋病奈瑟菌 46 次,单增李斯特菌 21 次,共 286 次。见表 3。

表 3 4 种鉴定置信度达 99% 以上的常见致病菌			
菌种	标本来源	数量(n)	检测置信度均值(%)
肺炎链球菌	痰液	154	99.9
沙门菌群	粪便	65	99.8
淋病奈瑟菌	尿道分泌物	46	99.9
单增李斯特菌	粪便、静脉血	21	99.9

3 讨 论

目前 Vitek 2 Compact 全自动微生物分析系统在临床微生物实验室应用广泛,主要用于临床病原微生物标本的检测及药敏鉴定。但 Vitek 2 Compact 全自动微生物分析系统存在菌种对照菌库不全、一次性可检测的标本数量少等缺点^[3];检测标本时需调配固定浓度菌液(0.5 麦氏单位),若有菌落较小或难以挑取的标本,如淋病奈瑟菌、肺炎链球菌等,则会增加菌液配制的难度和时间,从而影响结果发出。现今临床微生物实验室日均标本接收量不断增长,菌种鉴定需求扩大,应用 Vitek 2 Compact 全自动微生物分析仪检测到未知菌种,或遇到菌落不纯、生化反应结果不符等问题时,则需对鉴定的结果进行复查,加大了操作人员工作量,更重要的是延长了报告发出时间。

MALDI-TOF MS 是利用激光照射标本,使待检标本与基质液 CHCA 形成共结晶薄膜(基质/标本结晶),基质从激光中吸收能量使标本解吸,标本分子发生电离;形成的离子在仪器的电场作用下加速飞过飞行通道,离子的质荷比与飞行时间呈正比,通过计算到达检测器的飞行时间而测出质荷比,再通过专用软件分析比较,与数据库中的肽指纹图谱进行比对,从而得出所需的鉴定结果^[4]。而在疾病诊断与发生、发展的研究中,MALDI-TOF MS 在生物标志物的发掘和鉴定^[5]、病原微生物的鉴定和分型^[6]、靶蛋白的组织定位^[7]等方面都有了初步研究结果。

与 MALDI-TOF MS 不同,Vitek 2 Compact 全自动微生物分析仪是通过传统的细菌生化反应得出鉴定结果,检测前需要调配固定浓度的较纯菌液,操作因人而异,鉴定卡耗材较多且同步还需进行致病菌毒力实验等辅助分析方法进行鉴定。而 MALDI-TOF MS 鉴定一个标本平均耗时较短,一次性可对 192 个标本进行检测,操作简单(检测时可将标本直接涂抹于靶点上,与基质液进行反应)、只需要单个菌落标本就可以进行检测。对引起大叶性肺炎、淋病、食物中毒、败血症等疾病的肺炎链球菌、奈瑟菌、沙门菌、单增李斯特菌等临床常见致病菌的鉴定置信度可达到 99.8% 以上,真正达到了快捷、高通量和高精准的检测要求。更重要的是,MALDI-TOF MS 现有菌种对照库相对 Vitek 2 Compact 系统菌种对照库新增了 205 种菌株,包括许多不常见的非致病菌、条件致病菌及致病菌,而这类微生物在 Vitek 2 Compact 系统菌种数据库中无法查到,若临床标本中含有此类细

菌则不能得到准确的鉴定结果,从而影响报告的发出和精准的抗感染治疗。根据 MALDI-TOF MS 检测出的 206 例新增菌种分析,发现其中微黄奈瑟菌、短稳杆菌等为条件致病菌,短稳杆菌主要来源于患者的痰液标本,容易在老人或小孩免疫力低下时发生感染导致急性炎症;而堪萨斯分枝杆菌是毒力最强的非结核分枝杆菌,是肺部非结核分枝杆菌感染的最常见病原菌。本次统计新增菌种中条件致病菌的检出率为 17.0%,因此,应用 MALDI-TOF MS 能够对其进行准确鉴定十分关键。目前,MALDI-TOF MS 菌种对照库正在不断更新扩大,对检测更多的新增菌种带来的方便也是传统检测方法无法达到的。周末元等^[8]在研究中发现对于非发酵菌 MALDI-TOF MS 鉴定结果与 16S rRNA 序列分析符合率高,可以提高临床对少见非发酵菌鉴定的准确率。LUO 等^[9]认为 MALDI-TOF MS 在对非肠杆菌科革兰阴性杆菌、葡萄球菌、链球菌、肠球菌及芽孢杆菌的鉴定均超过 Vitek 2 Compact,表现出优异的鉴定水平。这一点也得到了王冰等^[10]的证实。另外统计期间内对于临床常见致病菌中奈瑟菌、沙门菌、肺炎链球菌、单增李斯特菌等共 286 例临床样本的鉴定置信度均值均达到 99.8% 以上,进一步说明 MALDI-TOF MS 对临床常见致病菌的鉴定优于传统鉴定方法。近年来,FOTHERGILLA 等^[11]及 LAVERGNE 等^[12]应用 MALDI-TOF MS 直接从阳性血培养鉴定,大大缩短了鉴定菌血症/败血症病原菌的时间。

综上所述,MALDI-TOF MS 具有菌种对照库大,鉴定准确度高,标本检测通量高等优点,与 Vitek 2 Compact 相比更能满足临床微生物检验诊断的需求,极大地提高了微生物鉴定和感染性疾病的诊断水平。随着 MALDI-TOF MS 菌种数据库的不断更新扩大,MALDI-TOF MS 更适于广泛地投入到临床微生物鉴定应用中。

参考文献

[1] 曹艳,黄一灵,徐艳玲,等. MALDI-TOF MS 技术在临床微生物检验领域的应用进展分析[J]. 临床与病理杂志, 2015,35(1):123-127.

[2] 杨细飞,刘威,夏菠,等. MALDI-TOF-MS 技术在细菌鉴定方面的应用研究[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(8): 1078-1081.

[3] 刘瑛,俞静,陈峰,等. Microflex™ MALDI-TOF MS 和 Vitek 2 Compact 全自动微生物分析系统对肠杆菌科细菌鉴定能力的比较[J]. 检验医学,2015,2(2):122-127.

[4] 顾兵,李永军. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术在临床微生物鉴定中的应用及价值[J]. 临床检验杂志, 2013,31(11):814-817.

[5] 张玲,郝艳梅,张世益,等. PCT 和 IL-6 在感染性疾病中的诊断价值[J]. 放射免疫学杂志,2012,25(5):557-559.

[6] GEKENIDIS M T,STUDER P,WTHRICH(下转第 542 页)

用。但本研究中 SK-OV-3 细胞生长环境中所存在的作为天然 TLR 配体的小分子物质仍未知,需进一步探讨研究。

参考文献

- [1] HEDE K. Protection; studies highlight importance of tumor microenvironment[J]. J Nat Cancer Inst, 2004, 96(15):1120-1121.
- [2] 季芳,狄文. 肿瘤微环境影响卵巢癌生物学行为的研究进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2012, 39(4):352-355.
- [3] MBEUNKUI F, JOHANN D J. Cancer and the tumor microenvironment; a review of an essential relationship[J]. Cancer Chem Pharm, 2009, 63(4):571-582.
- [4] MANTOVANI A. Cancer: inflaming metastasis[J]. Nature, 2009, 457(7225):36-37.
- [5] SHANG G S, LIU L, QIN Y W. IL-6 and TNF- α promote metastasis of lung cancer by inducing epithelial-mesenchymal transition [J]. Oncol Lett, 2017, 13(6):4657-4660.
- [6] POLLARD J W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(1):71-78.
- [7] 徐娟, 黄珮珩, 潘世扬, 等. 卵巢癌患者 TLR1、TLR2、TLR6 信号通路活化诱导 PBMC 前炎症细胞因子分泌[J]. 临床检验杂志, 2013, 26(8):584-587.
- [8] 徐娟, 潘世扬, 姜鉴芳, 等. 卵巢癌细胞株 SKOV3 对 THP-1 细胞 TLR 信号通路的作用[J]. 现代免疫学, 2014, 34(1):29-35.
- [9] SEEWALDT V L. Cancer: destiny from density[J]. Nature, 2012, 490(7421):490-491.
- [10] RIDNOUR L A, CHENG R Y, SWITZER C H, et al. Molecular pathways: toll-like receptors in the tumor microenvironment—poor prognosis or new therapeutic opportunity[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(6):1340-1346.
- [11] BASITH S, MANAVALAN B, YOO T H, et al. Roles of

toll-like receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense[J]. Arch Pharm Res, 2012, 35(8):1297-1316.

- [12] KIM S, TAKAHASHI H, LIN W W, et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis[J]. Nature, 2009, 457(7225):102-106.
- [13] UEMATSU S, AKIRA S. Toll-like receptors and innate immunity[J]. J Mol Med, 2006, 84(9):712-725.
- [14] ALEXOPOULOU L, HOLT AC, MEDZHITOV R, et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-Kappa B by Toll-like receptor 3[J]. Nature, 2001, 413(6857):732-738.
- [15] O'NEILL L A. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily[J]. Curr Top Microbiol, 2002, 270:47-61.
- [16] HUANG Y, CAI B, XU M, et al. Gene silencing of Toll-like receptor 2 inhibits proliferation of human liver cancer cells and secretion of inflammatory cytokines[J]. PLoS One, 2012, 7(7):e38890.
- [17] DINARELLO C A. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation[J]. Eur J Immunol, 2011, 41(5):1203-1217.
- [18] ELKABETS M, RIBEIRO V S, DINARELLO C A, et al. IL-1 β regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function [J]. Eur J Immunol, 2010, 40(12):3347-3357.
- [19] VORONOV E, CARMI Y, APTE R N. Role of IL-1-mediated inflammation in tumor angiogenesis[J]. Adv Exp Med Biol, 2007, 601:265-270.
- [20] LO C W, CHEN M W, HSIAO M, et al. IL-6 trans-signaling in formation and progression of malignant ascites in ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2011, 71(2):424-434.

(收稿日期:2017-08-18 修回日期:2017-11-10)

(上接第 536 页)

- S, et al. Beyond the matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) biotyping workflow; in search of micro-organism-specific tryptic peptides enabling discrimination of subspecies[J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(14):4234-4241.
- [7] FUJIMURA Y, MIURA D. MALDI mass spectrometry imaging for visualizing in situ metabolism of endogenous metabolites and dietary phytochemicals[J]. Metabolites, 2014, 4(2):319-346.
- [8] 周宋元, 黄颖, 徐元宏. MALDI-TOF MS 技术在鉴定临床少见非发酵菌中的应用[J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(9):69-73.
- [9] LUO Y, SIU G K, YEUNG A S, et al. Performance of the VITEK MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for rapid bacterial identification in two diagnostic centres in China[J]. J

Med Microbiol, 2015, 64(Pt 1):18-24.

- [10] 王冰, 任晓庆, 褚美玲, 等. MALDI-TOF 质谱仪在临床常见细菌鉴定中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(16):2228-2230.
- [11] FOTHERGILLA A, KASINATHANA V, HYMANB 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.
- [12] LAVERGNE R A, CHAUVIN P, VALENTIN A, et al. An extraction method of positive blood cultures for direct identification of Candida species by Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry[J]. Med Mycol, 2013, 51(6):652-656.

(收稿日期:2017-09-26 修回日期:2017-11-16)