

• 论 著 •

## MALDI-TOF MS 直接检测清洁中段尿液标本中病原菌的价值\*

徐令清, 张冈毅, 钟子莹, 温伟洪, 汤英贤, 钟国权, 李介华, 刘丽忠<sup>△</sup>

(广州医科大学附属第六医院/清远市人民医院检验科, 广东清远 511518)

**摘要:**目的 探讨基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS)对清洁中段尿液标本中细菌的鉴定价值。方法 收集 300 份清洁中段尿液标本,接种于血琼脂平板上,对尿液标本进行离心处理,采用 MALDI-TOF MS 对离心后的尿沉渣进行鉴定,同时对培养出的单个菌落进行鉴定,并用 Vitek 2 Compact 及 BD phoenixM50 全自动微生物分析系统进行鉴定复核。结果 300 份清洁中段尿液标本中,63 份培养鉴定到 1 种细菌,MALDI-TOF MS 的菌株鉴定结果与两种全自动微生物分析系统的细菌鉴定结果的符合率为 100.0%;MALDI-TOF MS 在以上 63 份尿沉渣中直接检出 25 株细菌,检出率为 39.7%(25/63);其中大肠埃希菌 15 株,占 60.0%(15/25);肺炎克雷伯菌 4 株,占 16.0%(4/25);粪肠球菌 2 株,占 8.0%(2/25);产气肠杆菌 1 株,里昂葡萄球菌 1 株,黏质沙雷菌 1 株,分别各占 4.0%(1/25);20 份标本培养出两种细菌,应用 MALDI-TOF MS 直接在 2 份尿沉渣中检出 2 株屎肠球菌,检出率为 10.0%(2/20)。结论 MALDI-TOF MS 鉴定准确率高,可从临床标本直接检测病原菌,节省培养时间,对两种混合菌感染的标本也有一定鉴定能力。

**关键词:**基质辅助激光解析电离飞行时间质谱; 病原菌; 中段尿; 16sRNA**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2020.22.015 **中图法分类号:**446.5**文章编号:**1673-4130(2020)22-2748-04**文献标识码:**A

## Value of identifying pathogens directly in clean midstream urine samples by MALDI-TOF MS\*

XU Lingqing, ZHANG Gangyi, ZHONG Ziying, WEN Weihong,

TANG Yingxian, ZHONG Guoquan, LI Jiehua, LIU Lizhong<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, the Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University/Qingyuan People's Hospital, Qingyuan, Guangdong 511518, China)

**Abstract:** **Objective** To analysis the value of matrix-assisted laser analysis and ionization time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF MS) for identifying bacteria in clean midstream urine specimens. **Methods** A total of 300 clean midstream urine specimens were collected and inoculated on blood agar plates, then centrifuged, and the sediments after centrifugation and the cultured singled colony were identified by MALDI-TOF MS, Vitek 2 Compact and BD phoenixM50 automatic bacteria identification instrument were used for identification review. **Results** Among 300 clean midstream urine specimens, 63 samples were cultured with 1 type of bacteria. The coincidence rate of strain identification by MALDI-TOF MS with the two kinds of automatic bacterial identification instrument was 100.0%. MALDI-TOF MS directly detected 25 strains of bacteria among the above 63 urine sediments. The detection rate was 39.7%(25/63). Among them, 15 strains of *Escherichia coli*, accounting for 60.0%(15/25), 4 strains of *Klebsiella pneumoniae*, accounting for 16.0%(4/25), 2 strains of *Enterococcus faecalis*, accounting for 8.0%(2/25), 1 strain of *Enterobacter aerogenes*, 1 strain of *Staphylococcus leonii*, 1 strain of *Serratia marcescens*, each accounting for 4.0%(1/25). Two kinds of bacteria were cultured from 20 specimens, and the dominant bacteria in the 2 specimens were directly detected in the urine sediment by MALDI-TOF MS, and the detection rate was 10.0%(2/20). **Conclusion** MALDI-TOF MS has a high identification accuracy rate. It could detect pathogenic bacteria directly from clinical specimens, saving culture time, and has a certain ability to identify specimens of two kinds of mixed bacteria.

**Key words:** MALDI-TOF MS; pathogens; midstream urine; 16sRNA

\* 基金项目:广东省中医药局项目(20201407);广东省医学科学技术研究基金项目(A2015226);广东省科技创新战略专项资金项目(DZX-QY002);广东省清远市科技计划项目(2019163);广东省清远市人民医院医学科研基金项目(20190209)。

作者简介:徐令清,男,副主任技师,主要从事微生物耐药机制研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: Lindallz@163.com。

本文引用格式:徐令清,张冈毅,钟子莹,等. MALDI-TOF MS 直接检测清洁中段尿液标本中病原菌的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(22):2748-2751.

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS)是一种新型的软电离生物质谱仪,对临床微生物的细菌鉴定具有非常大的作用,不仅能快速鉴定纯菌落,还能直接从临床标本中检测细菌,不需培养,只需进行简单的预处理,如离心、血细胞溶解等,还可以进行分子水平的基因分型、药物敏感性分析和无菌体液的直接鉴定等。目前,临床主要依靠传统手工法及自动化鉴定仪检测病原微生物,传统的技术具有周期长、费用高、鉴定能力有限和信息滞后的缺陷。但 MALDI-TOF MS 能够完成微生物多种成分的分析,包括蛋白质、脂类、多肽等<sup>[1]</sup>。MALDI-TOF MS 技术应用于细菌的鉴定,实际上就是检测具有属、种或亚型特异性的生物标志物质量信号,它主要通过分析不同细菌具有的不同蛋白质指纹图谱,对鉴定结果与数据库中已知的细菌进行比对,得出各种细菌鉴定结果。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 收集 2018 年 10 月至 2019 年 3 月本院住院及门诊患者的清洁中段尿液标本共 300 份。

**1.2 仪器与试剂** 仪器: MALDI-TOF MS 购自德国布鲁克公司, Vitek 2 Compact 全自动微生物分析系统(Vitek 2 Compact)购自法国生物梅里埃公司, BD phoenixM50 全自动微生物分析系统(BD M50)购自美国 BD 公司, T100TMP-PCR 扩增仪、电泳仪、Gel Dox™ XR+凝胶成像系统购自美国 BIO-RAD 公司。试剂: MALDI-TOF MS 所用试剂包括三氟乙酸、色谱级乙腈、70%甲酸和无水乙醇,均为厂家配套试剂。哥伦比亚血琼脂平板购自广州迪景微生物科技有限公司;细菌 DNA 提取试剂盒、2×Taq PCR MasterMix、Gel Red 核酸染料和 Marker DNA Ladder 购自北京天根生化科技有限公司;引物由上海生物工程股份有限公司合成。

## 1.3 方法

**1.3.1 尿液标本培养** 采用 10 μL 的接种环将中段尿液标本接种于哥伦比亚血琼脂平板上, 37℃ CO<sub>2</sub> 培养箱培养 18~24 h。

**1.3.2 尿液标本质谱分析前处理** 取 10 mL 的尿液标本倒入无菌的 15 mL 离心管中,以 2 000 r/min 转速离心 4 min,去除蛋白。离心完毕后,将上清液倒入另外一支无菌的 15 mL 离心管中,在 20℃ 下以 12 000 r/min 离心 5 min。弃上清液,在沉淀中加入 1 mL 0.45%氯化钠注射液,转到 1.5 mL 的 EP 管中,充分振荡混匀后 12 000 r/min 离心 5 min。弃上清液,用 1 mL 去离子水洗涤沉淀,同样转速和时间离心,弃上清液,留沉淀待用。

**1.3.3 MALDI-TOF MS 分析尿沉渣** 采用加样枪吸取 1 μL 沉淀物均匀涂抹于 96 孔靶板上,待干燥。再加入 1 μL 70%甲酸,干燥,再加上 1 μL 基质液涂抹均匀,干燥后进行质谱分析。标本干燥后将靶板放

入 MALDI-TOF MS 检测。MALDI-TOF MS 收集的质量范围为 2 000~20 000 Da,图谱采集使用 Flex Control 软件,使用 Bruker Biotyper 软件对检测结果与标准数据库进行对比,用分值量化和判定结果,评分≥2.0 分表示可鉴定到种的水平;评分为 1.7~<2.0 分表示可鉴定到属的水平;评分<1.7 分则表示无法给出可信的鉴定结果。

**1.3.4 菌落鉴定** 首先采用 MALDI-TOF MS 进行菌落鉴定,然后使用 Vitek 2 Compact、BD M50 两种仪器对菌落进行复核鉴定。

**1.3.5 16sRNA 检测** 尿沉渣直接通过 MALDI-TOF MS 分析得到的阳性结果中挑选出 7 株细菌提取 DNA,进行 16sRNA 扩增,具体操作参照文献[13]。PCR 产物送上海生工生物工程股份有限公司测序,验证 MALDI-TOF MS 的准确性。

**1.4 统计学处理** 采用 Excel2007 软件进行数据处理及统计学分析。

## 2 结果

**2.1 3 种仪器对单一菌感染尿液标本培养菌落鉴定符合率** 300 份中段尿液标本中,3 种仪器均检测出单一菌感染 63 株,其中肺炎克雷伯菌 8 株,大肠埃希菌 40 株,粪肠球菌 9 株,铜绿假单胞菌 3 株,产气肠杆菌 1 株,里昂葡萄球菌 1 株,黏质沙雷菌 1 株, MALDI-TOF MS 菌落鉴定结果与 BD M50 及 Vitek 2 Compact 检测结果一致,符合率为 100.0%。尿液标本培养结果表明,革兰阴性菌为尿路感染主要的致病菌,大肠埃希菌最为常见(57.7%),肺炎克雷伯菌次之(15.4%);革兰阳性菌也占少数,以粪肠球菌为主(7.7%)。

**2.2 单一菌感染中 MALDI-TOF MS 检测尿沉渣与菌落鉴定结果的比较** MALDI-TOF MS 直接检测尿沉渣共得到 25 份阳性结果,尿沉渣总检出率为 39.7%(25/63);其中肺炎克雷伯菌培养后采用 MALDI-TOF MS 进行菌落鉴定共检出菌株 8 株,尿沉渣检出 4 株,尿沉渣检出率为 50.0%;大肠埃希菌培养后采用 MALDI-TOF MS 进行菌落鉴定共检出菌株 40 株,尿沉渣检出 15 株,尿沉渣检出率为 37.5%;粪肠球菌培养后采用 MALDI-TOF MS 进行菌落鉴定共检出菌株 9 株,尿沉渣检出 2 株,尿沉渣检出率为 22.2%;铜绿假单胞菌培养后采用 MALDI-TOF MS 进行菌落鉴定共检出菌株 3 株,尿沉渣检出 1 株,尿沉渣检出率为 33.3%;产气肠杆菌、里昂葡萄球菌、黏质沙雷菌培养后采用 MALDI-TOF MS 进行菌落鉴定共检出菌株各 1 株,尿沉渣检出各 1 株,尿沉渣检出率均为 100.0%。见表 1。

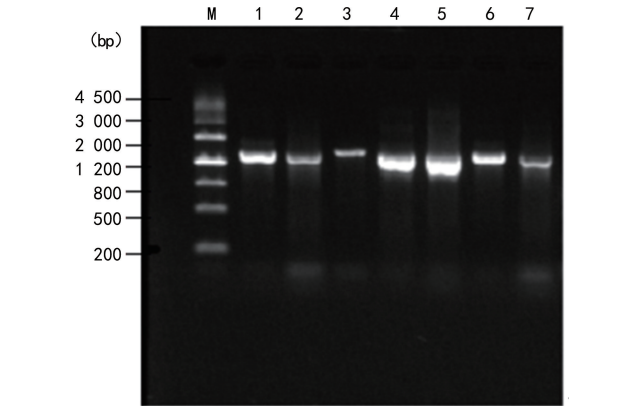
**2.3 混合菌感染中 MALDI-TOF MS 尿沉渣检测与菌落鉴定结果的比较** 培养结果为两种细菌感染的标本有 20 份, MALDI-TOF MS 进行培养菌落鉴定的优势菌为粪肠球菌 6 株(30.0%),大肠埃希菌 5 株

(25.0%),溶血葡萄球菌 4 株(20.0%),无乳链球菌 2 株(10.0%),尿肠球菌 2 株(10.0%),铜绿假单胞菌 1 株(5.0%),非优势菌主要为表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌、棒状杆菌、气单胞菌、链球菌等常见污染菌,而 MALDI-TOF MS 直接从 2 份尿沉渣中检出 2 株尿肠球菌(优势菌  $>10^4$  CFU/mL),检出率为 10.0%(2/20),其他优势菌及非优势菌在尿沉渣中均未直接检出。

| 表 1 单一菌感染的中段尿液标本菌株检出情况 |                       |                  |          |       |
|------------------------|-----------------------|------------------|----------|-------|
| 细菌名                    | MALDI-TOF MS 尿沉渣检测(n) |                  | 菌落鉴定 检出率 |       |
|                        | 检出 <sup>#</sup>       | 未检出 <sup>*</sup> | (n)      | (%)   |
| 肺炎克雷伯菌                 | 4                     | 4                | 8        | 50.0  |
| 大肠埃希菌                  | 15                    | 25               | 40       | 37.5  |
| 粪肠球菌                   | 2                     | 7                | 9        | 22.2  |
| 铜绿假单胞菌                 | 1                     | 2                | 3        | 33.3  |
| 产气肠杆菌                  | 1                     | 0                | 1        | 100.0 |
| 里昂葡萄球菌                 | 1                     | 0                | 1        | 100.0 |
| 黏质沙雷菌                  | 1                     | 0                | 1        | 100.0 |

注: <sup>#</sup> 质谱评分  $\geq 2.0$  分的菌株, <sup>\*</sup> 质谱仪上无峰图或评分  $<2.0$  分的菌株。

**2.4 16sRNA 扩增及测序结果** 7 株细菌扩增结果见图 1,测序经过 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 网站 BLAST 比对,分别为肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、粪肠球菌、铜绿假单胞菌、产气肠杆菌、里昂葡萄球菌、黏质沙雷菌,与 Vitek 2 Compact 及 MALDI-TOF MS 鉴定结果完全一致。



注:M 为标记物,200~4 500 bp;泳道 1~7 分别为肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、粪肠球菌、铜绿假单胞菌、产气肠杆菌、里昂葡萄球菌、黏质沙雷菌。

图 1 7 株细菌 16sRNA 扩增结果

### 3 讨 论

MALDI-TOF MS 以快速、准确、重复性好、高通量的特点在细菌的鉴定、耐药性和毒力监测中发挥越来越重要的作用<sup>[2]</sup>。MALDI-TOF MS 还应用于其他方面的研究,例如用于流行病学的研究、基因分型、血培养报阳瓶的直接鉴定(MALDI Sepsityper<sup>TM</sup> 试剂盒)和其他体液或选择性肉汤培养标本的直接鉴定等。传统的细菌培养和生化鉴定方法无法对大肠埃

希菌、沙门氏菌、霍乱弧菌等多种血清型病原菌进行分类,而现在 MALDI-TOF MS 对多种血清型细菌进行鉴定和分类已得到初步应用<sup>[3]</sup>。王晔茹等<sup>[4]</sup>应用优化的 MALDI-TOF MS 试验条件对含有沙门氏菌的患者粪便标本进行检测和分型,并与血清学分型进行比较。对于血培养报阳的标本,MALDI-TOF MS 的鉴定率较高,可用于处理混合感染的标本;KOK 等<sup>[5]</sup>使用 MALDI Sepsityper<sup>TM</sup> 试剂盒对 507 份血培养阳性的标本直接进行 MALDI-TOF MS 检测,鉴定出 379 份(74.8%)阳性标本,其中 358 份为单一菌感染,21 份为混合菌感染。

目前,MALDI-TOF MS 技术在临床微生物的诊断上具有优势,主要应用于细菌和真菌的菌种鉴定,但是在某些方面还是存在不足。如在检测单一菌种的标本时,MALDI-TOF MS 的检测结果可能无法达到菌落鉴定的相对分值,如菌落鉴定为大肠埃希菌的 40 份尿液标本中,有 11 份标本直接检测评分  $\geq 2.0$  分,4 份标本评分为 1.7~ $<2.0$  分,1 份标本评分  $<1.7$  分,剩余 14 份标本无图谱,而其他尿沉渣检测不是大肠埃希菌的标本有 10 份。造成上述这种现象的主要原因可能包括标本中细菌的含量少,菌量不一,存在部分的干扰物质,光谱采集不准确等;而菌量较多的峰图信号好,鉴定值高,结果可靠;菌量少的峰图信号不好,鉴定准确度不高,检测结果不佳;未检出的和无法鉴定是大肠埃希菌的标本可能是因为菌量太少,也有可能是尿液标本中还存在蛋白质、混合细菌等干扰物质,导致检测结果不可靠<sup>[6-7]</sup>。也有学者提出“短期培养法”,4~6 h 后采集菌膜并用 MALDI-TOF MS 直接检测,准确率可得到明显提高<sup>[8]</sup>。

在本研究中,中段尿液标本经培养后菌落鉴定为单一菌感染的 63 份标本,而 MALDI-TOF MS 检测尿沉渣的鉴定阳性率为 39.7%(25/63);两种细菌混合感染的标本有 20 份,MALDI-TOF MS 鉴定的阳性率为 10.0%(2/20)。从中可以看出两种细菌混合感染的阳性率远低于单一细菌感染的阳性率<sup>[9]</sup>。而 WANG 等<sup>[10]</sup>的研究发现尿液标本中两种细菌只有优势菌能够被检出。在本研究中,MALDI-TOF MS 检测混合菌感染的中段尿液标本时,优势菌数量比非优势菌数量高一个数量级,受非优势菌干扰的概率较低。

MALDI-TOF MS 直接检测尿沉渣与尿液标本培养菌落鉴定有一定的差异,可能受到以下几种因素影响<sup>[11]</sup>:(1)尿液标本直接洗涤离心,细菌和蛋白可能混在沉淀中,导致质谱峰图不佳,检出率低;(2)尿液标本没有经过培养,菌量少,从而无法得出鉴定结果;(3)MALDI-TOF MS 光谱采集不准确,菌量低于检出限等。

尿路感染是人类常见的感染性疾病,95% 以上的尿路感染是由单一细菌引起的,其中约 90% 的门诊患

者和 50% 的住院患者感染的病原菌为大肠埃希菌,但也有少部分患者感染金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、念珠菌等。传统的尿路感染诊断依靠尿液分析、尿沉渣技术、革兰染色镜检和细菌培养等,但目前临床更偏向于使用快速准确的检测技术。有研究对尿路感染的 220 份尿液标本进行常见的 MALDI-TOF MS 直接鉴定,当菌量  $>10^5$  CFU/mL 时,鉴定到属的检出率为 92.7%,鉴定到种的检出率为 91.8%,特别是对大肠埃希菌的鉴定,检出率达到 97.6%,检出时间也极大缩短<sup>[12]</sup>。临床上尿液标本的培养一般需要 24 h,应用 MALDI-TOF MS 则可以快速完成菌种的鉴定。对于混合菌感染的尿液标本, MALDI-TOF MS 也可报告优势菌,节省了分纯培养的时间,为获得更好的治疗争取了时间并减少了费用。而 16sRNA 扩增技术的灵敏度与培养结果具有很好的一致性;并且在诊断使用过抗菌药物的患者标本中,具有更多的优越性<sup>[13]</sup>。

#### 4 结 论

MALDI-TOF MS 的推广和使用,不仅能优化检验流程,还可以节省大量的成本和时间,快速准确地鉴定病原菌,对临床细菌感染的诊断及治疗具有重大意义。

#### 参考文献

- [1] 张明新,朱敏,王玫,等.应用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴定常见细菌和酵母菌[J].中华检验医学杂志,2011,34(11):988-992.
- [2] 秦娟秀,李敏. MALDI-TOF MS 指纹图谱技术在病原微生物分型中的应用前景[J].中华检验医学杂志,2015,38(6):367-369.
- [3] 袁璐,伍勇.基质辅助激光解析电离飞行时间质谱在临床病原微生物鉴定中的应用进展[J].中华微生物学和免疫学杂志,2013,33(2):148-151.
- [4] 王晔茹,崔生辉,李凤琴.基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱在沙门菌检测和鉴定分型中的应用研究[J].卫生研究,2008,37(6):685-689.
- [5] KOK J, THOMAS L C, OLMA T, et al. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption ionization Sepsityper™ and time of flight mass spectrometry[J]. PLoS One, 2011, 6(8):e23285.
- [6] 王琳,李佳萍,陈功祥,等. MALDI-TOF MS 在中段尿液标本细菌直接检测中的应用[J].检验医学,2015,30(2):108-112.
- [7] 田月如,官明,李敏,等. MALDI-TOF MS 技术在临床微生物诊断中的挑战[J].中华检验医学杂志,2018,41(8):559-562.
- [8] 张景皓,方毅,张艳梅,等. MALDI-TOF MS 结合短期培养基快速检测中段尿液标本中的病原菌[J].检验医学,2017,32(4):326-330.
- [9] 杨溪,王新华,隋文君,等. MALDI-TOF MS 直接鉴定原始尿液中的病原菌[J].中华检验医学杂志,2013,36(11):1042-1044.
- [10] WANG X H, ZHANG G, FAN Y Y, et al. Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry[J]. J Microbiol Methods, 2013, 92(3):231-235.
- [11] 陈飞,胡玢婕,赵虎. MALDI-TOF MS 在临床微生物标本直接检测中的应用[J].检验医学,2015,30(7):750-756.
- [12] FERREIRA L, SÁNCHEZ-JUANES F, GONZÁLEZ-AVILA M, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(6):2110-2115.
- [13] 汪峰,刘彩林,廖亚龙,等.应用 16S rRNA 宽范围聚合酶链反应快速检测临床无菌体液感染[J].检验医学,2011,26(12):865-868.
- [14] (收稿日期:2020-03-28 修回日期:2020-06-05)
- [15] JIANG H, CHEN Z, CAO H, et al. Peroxidase-like activity of chitosan stabilized silver nanoparticles for visual and colorimetric detection of glucose[J]. Analyst, 2012, 137(23):5560-5564.
- [16] LIU Y, ZHU G, YANG J, et al. Peroxidase-like catalytic activity of Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> nanocrystals prepared by a colloidal route[J]. PLoS One, 2014, 9(10):e109158-e109165.
- [17] LIN Y, REN J, QU X. Catalytically active nanomaterials: a promising candidate for artificial enzymes[J]. Accounts Chemical Res, 2014, 47(4):1097-1105.
- [18] NOVAK M J, PATTAMMATTEL A, KOSHMERL B, et al. "Stable-on-the-table" enzymes: engineering the enzyme-graphene oxide interface for unprecedented kinetic stability of the biocatalyst[J]. ACS Catalysis, 2015, 6(1):339-347.
- [19] MATSUO T, HAYASHI A, ABE M, et al. Meso-unsubstituted iron corrole in hemoproteins: remarkable differences in effects on peroxidase activities between myoglobin and horseradish peroxidase[J]. J American Chemical Society, 2009, 131(42):15124-15125.
- [20] 沈东华,张敏健.还原型谷胱甘肽对基于 Trinder 反应生化项目检测结果干扰的探讨[J].国际检验医学杂志,2014,35(20):2844-2845.
- [21] 国秀芝,张江涛,侯立安,等.羟苯磺酸钙对尿酸酶-过氧化物酶偶联法尿酸检测的干扰研究[J].中华检验医学杂志,2015,38(9):600-604.
- [22] 张栋梁,王跃荣,丁钱超. BECKMAN-COULTER AU5800 生化分析仪检测 2 例尿酸结果假性偏低的排除与浅析[J].检验医学,2016,31(2):128-130.
- [23] (收稿日期:2019-12-08 修回日期:2020-06-11)

(上接第 2747 页)