

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.35.005
文章编号: 1005-8982 (2018) 35-0023-04

质谱快速鉴定血培养阳性标本的方法研究

宋启飞, 刘敏雪, 李梦娇, 刘雅, 邓劲, 谢轶

(四川大学华西医院, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 建立快速、精准的细菌质谱鉴定方法, 以缩短血培养阳性的实验周转时间。**方法** 共收集血培养阳性瓶 91 个 (活性炭吸附瓶), 采集培养液分别转种肉汤和血平板增菌培养 4 h 后, 用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 进行菌种鉴定。以血平板培养 24 h 的质谱鉴定结果为对照, 比较 2 种方法细菌质谱鉴定符合率。**结果** 91 株细菌包括 51 株革兰阴性菌和 40 株革兰阳性菌。4 h 肉汤增菌法和 4 h 血平板培养法鉴定到种的符合率分别为 46.15% 和 89.01%, 无鉴定结果率分别为 47.25% 和 3.30%, 错误鉴定率分别为 3.30% 和 4.40%。2 种方法鉴定到种的符合率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 4 h 血平板培养法鉴定到种的符合率高于 4 h 肉汤增菌法。2 种方法对革兰阴性菌鉴定到种的符合率分别为 58.82% 和 94.12%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 4 h 血平板培养法高于 4 h 肉汤增菌法。2 种方法对革兰阳性菌鉴定到种的符合率分别为 30.00% 和 82.50%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 4 h 血平板培养法高于 4 h 肉汤增菌法。**结论** 4 h 血平板培养质谱鉴定法可快速鉴定血培养阳性标本中的病原菌。

关键词: 培养; MALDI-TOF MS/质谱法; 生物学鉴定法; 符合率

中图分类号: R 446.5

文献标识码: A

Establishment of a method of rapid identification of positive blood culture samples by MALDI-TOF MS

Qi-fei Song, Min-xue Liu, Meng-jiao Li, Ya Liu, Jin Deng, Yi Xie

(West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To establish a rapid and accurate method of bacterial identification in order to shorten turnaround time of positive blood cultures. **Methods** A total of 91 bacteria were collected from positive blood cultures, incubated in nutrient broth and blood agar plate respectively for 4 h and then identified by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Taking the results of MALDI-TOF MS of 24-h blood plate culture as the standard, the coincidence rates of the two incubation methods for identification of bacteria by mass spectrometry were compared. **Results** Among the 91 bacteria there were 51 strains of Gram-negative bacteria and 40 strains of Gram-positive bacteria. In all, 46.15% and 89.01% of the isolates were accurately identified after 4-h incubation in nutrient broth and blood plate respectively, while there were 47.25% and 3.30% strains with no results, and the error identification rates were 3.30% and 4.40%, respectively. The agreement rates of the two methods had significant difference ($P < 0.05$). The coincidence rates of 4-h incubation in nutrient broth and blood plate were 58.82% and 94.12% respectively for Gram-negative bacteria at species level ($P < 0.05$), the latter was significantly higher than the former. The coincidence rates of 4-h incubation in nutrient broth and blood plate were 30.00% and 82.50% for Gram-positive bacteria ($P < 0.05$), the accuracy of blood agar plate inoculation was better than that of nutrient broth culture. **Conclusions** Using technology of MALDI-TOF MS, rapid bacteria identification of positive blood culture samples can be achieved after 4-h incubation in blood agar plate.

Keywords: blood culture; MALDI-TOF MS/mass spectrometry; biological assay; coincidence rate

收稿日期: 2018-06-22

[通信作者] 谢轶, E-mail: xie_yi_77@163.com

血培养可有效检测出导致血流感染的病原菌,是临床诊断血流感染的金标准^[1-3]。在菌血症、脓毒血症等严重感染患者中,及早使用敏感抗菌药物可有效降低患者的病死率^[4]。有研究显示,血流感染病原菌鉴定报告时间每延迟 1 h,患者存活率降低 7.6%^[5]。然而,目前的血培养检验流程中,血培养瓶报阳后,仍需 36 ~ 48 h 才能得到最终的菌种鉴定报告。本研究尝试摸索一种血培养阳性标本的快速、精准鉴定方法,以缩短血培养阳性的周转时间(turnaround time, TAT),为临床医生提供更为及时、精准的用药指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

收集 2016 年 7 月—2016 年 11 月四川大学华西医院临床送检的非重复的血培养阳性标本 91 份。活性炭血培养瓶(法国生物梅里埃公司),血平板(郑州安图生物技术有限公司),营养肉汤培养基(广东环凯微生物科技有限公司),基质液 HCCA(德国 Bruker Daltonic 公司),75% 酒精,75% 甲酸。

1.2 仪器与设备

Bact/Alert 3D 血培养仪(法国生物梅里埃公司),MALDI-TOF MS 检测系统(德国 Bruker Daltonic 公司),二氧化碳孵箱(日本三洋公司),隔水式恒温培养箱(上海恒一精密仪器有限公司),高速离心机(深圳市科力易翔仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 血培养阳性标本处理 将 91 份血培养阳性标本(活性炭血培养瓶)放入 Bact/Alert 3D 血培养仪,系统自动孵育和检测,阳性报警时取出血培养瓶,用 75% 酒精消毒血培养瓶口,抽取阳性瓶内培养液进行涂片和革兰染色。将血培养阳性瓶中的培养液分别转种至肉汤和血平板。将 100 μ l 培养液转种至 2 ml 肉汤管中混匀,振荡孵育 4 h, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 离心,作为肉汤增菌组;同时将 100 μ l 培养液转种至血平板,5% ~ 10% 二氧化碳孵箱,37 $^{\circ}$ C 培养 4 h,作为血平板培养组;同时分别转种另一块血平板,5% ~ 10% 二氧化碳孵箱,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,作为对照组。

1.3.2 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 鉴定 ① 4 h 肉汤增菌法:取经 4 h 增菌培养的肉汤 1 ml 至 EP 管中,

8 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,取 EP 管底部 1 μ l 细菌沉淀,制备质谱靶板;② 4 h 血平板培养法:挑取经 4 h 血平板培养的菌膜 1 μ l 制备质谱靶板。室温干燥后,进样至 MALDI-TOF MS 系统中进行菌种鉴定。用 IVD 细菌测试标准品进行质谱分析前仪器参数校正,质谱鉴定操作按照质谱仪标准程序进行;③ 对照组:取培养 24 h 的血平板上菌落,按上述方法进行质谱鉴定,将鉴定结果作为对照。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件,计数资料以率(%)表示,比较采用四格表 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 种方法的细菌质谱鉴定结果总符合率比较

4 h 肉汤增菌法的质谱鉴定到种的符合率为 46.15% (42/91),4 h 血平板培养法为 89.01% (81/91),经 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2=38.146$, $P=0.000$),4 h 血平板培养法细菌质谱鉴定到种的符合率高于 4 h 肉汤增菌法。4 h 肉汤增菌法中 43 株菌无质谱鉴定结果,占 47.25%,3 株菌质谱鉴定错误,占 3.30%。4 h 血平板培养法中 3 株菌无质谱鉴定结果,占 3.30%,4 株菌质谱鉴定错误,占 4.40%。2 种方法无鉴定结果率比较,经 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2=46.547$, $P=0.000$),4 h 血平板培养法的无鉴定结果率低于 4 h 肉汤增菌法。2 种方法错误鉴定率比较,经 Fisher 确切概率法分析,差异无统计学意义($P=0.500$)。

2.2 2 种方法对革兰阳性菌、革兰阴性菌的鉴定结果比较

91 例血培养阳性瓶中,分离出革兰阳性菌 40 株,革兰阴性菌 51 株。40 株革兰阳性菌中,4 h 肉汤增菌法质谱鉴定到种的符合率为 30.00% (12/40),4 h 血平板培养法质谱鉴定到种的符合率为 82.50% (33/40)。51 株革兰阴性菌中,4 h 肉汤增菌法质谱鉴定到种的符合率为 58.82% (30/51),4 h 血平板培养法质谱鉴定到种的符合率为 94.12% (48/51)。4 h 血平板培养法对革兰阳性菌和革兰阴性菌鉴定到种的符合率与 4 h 肉汤增菌组比较,经 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2=4.943$ 和 17.654, $P=0.026$ 和 0.000),4 h 血平板培养法对革兰阳性菌和革兰阴性菌鉴定到种的符合率高于 4 h 肉汤增菌法。

2.3 2 种方法对肠杆菌科细菌的质谱鉴定结果比较

革兰阴性菌中肠杆菌科细菌 41 株, 经 4 h 肉汤增菌后质谱正确鉴定到种 28 株, 占 68.29% (28/41); 经 4 h 血平板培养后质谱正确鉴定到种 41 株, 占 100.00% (41/41)。4 h 血平板培养法与 4 h 肉汤增菌法鉴定到种的符合率比较, 经 χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2=15.449, P=0.000$), 4 h 血平板培养法鉴定到种的符合率高于 4 h 肉汤增菌法。

2.4 2 种方法对其他常见菌的质谱鉴定结果比较

6 株鲍曼不动杆菌和 5 株金黄色葡萄球菌在 4 h 肉汤增菌法中均未鉴定出结果, 在 4 h 血平板培养法中全部鉴定到种。在凝固酶阴性葡萄球菌、肠球菌和念珠菌中, 4 h 血平板培养法的鉴定符合率也高于 4 h 肉汤增菌法 ($\chi^2=18.114, P=0.000$)。2 种方法对 1 株具核酸杆菌和 1 株咽峡炎链球菌在 4 h 增菌后均未鉴定成功, 但对 1 株产单李斯特菌, 4 h 肉汤增菌法可鉴定到种, 4 h 血平板培养法可鉴定到属。

3 讨论

近年来新发展起来的 MALDI-TOF MS 相对传统细菌培养鉴定流程, 可以更快速、准确地鉴定出血培养阳性标本中的细菌, 缩短血培养阳性的实验 TAT 时间, 为临床医生提供更为及时的用药指导。血培养送检规范中要求在抗生素使用前进行血液采集, 然而在菌血症、脓毒血症等严重感染的救治过程中患者可能已使用抗生素, 之后才采集血培养。采集的血液中含有抗生素会降低血培养阳性率^[6]。因而, 血培养瓶中往往添加抗生素吸附剂 (如树脂或活性炭), 可有效吸附一定量的抗生素, 从而提高血培养阳性率。然而, 血培养瓶中的活性炭成分会干扰质谱的鉴定结果, 不利于血培养阳性瓶中病原菌的质谱鉴定。本研究尝试用 MALDI-TOF MS 对血培养阳性标本经肉汤和血平板增菌 4 h 后直接质谱鉴定, 摸索血培养阳性标本的质谱快速鉴定流程, 为临床缩短血培养阳性标本病原菌鉴定时间提供参考方法。

本研究血培养阳性标本检出的细菌中大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌及表皮葡萄球菌占前 3 位, 是患者感染最普遍的细菌。肠杆菌科细菌和凝固酶阴性葡萄球菌比例与高丽钦^[7]、徐修礼^[8]等的报道基本一致。肠杆菌科细菌、葡萄球菌是菌血症和败血症的主要病原菌^[7]。本研究探索的 4 h 血平板培养法对肠杆菌

科细菌鉴定到种的符合率达 100.00% (41/41), 对凝固酶阴性葡萄球菌鉴定到种的符合率也可达 83.33% (20/24)。该方法能够快速、准确地鉴定出肠杆菌科细菌, 对临床医生避免经验用药, 减少患者并发症, 提高治愈率具有重要的临床意义。

2 种方法对革兰阴性菌鉴定符合率均优于革兰阳性菌, 与国内外研究报道基本一致^[9-12]。其原因可能与革兰阴性菌比革兰阳性菌更易生长, 革兰阳性菌对生长条件要求苛刻, 不易生长等因素有关。6 株鲍曼不动杆菌和 5 株金黄色葡萄球菌在 4 h 肉汤增菌后均未鉴定出结果, 但在 4 h 血平板培养后全部鉴定成功, 可能是血平板相比肉汤, 更有利于鲍曼不动杆菌和金黄色葡萄球菌的生长和质谱鉴定, 需进一步实验予以证实。

运用 MALDI-TOF MS 对细菌进行鉴定时, 细菌培养基类型、样品制备方法、离心速度、分析软件等的标准不一样, 会对细菌质谱鉴定的结果产生影响^[13, 14]。本研究中, 4 h 肉汤增菌法的细菌质谱鉴定符合率较低, 这可能与肉汤培养基的营养成分 (如蛋白质)、培养基性质及培养方式有关, 还需进一步改善该方法的实验流程。

本研究中, 4 h 血平板培养法细菌质谱鉴定到种的总符合率为 89.01%, 可快速鉴定血培养阳性标本中的病原菌, 并有高鉴定符合率。但本研究存在一定局限性, 仅收集 91 例样本, 样本量过少, 可能对结果产生偏移, 需增加样本数量及菌种的多样性。而该方法对肠杆菌科、葡萄球菌等生长较快的细菌快速鉴定更具优势, 对有特殊培养要求的革兰阳性菌等的鉴定符合率相对较低。

参 考 文 献:

- [1] BARBERINO M G, SILVA M O, ARRAES ACP, et al. Direct identification from positive blood broth culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)[J]. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2017, 21(3): 339-342.
- [2] 汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2009 年中国 CHINET 细菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(5): 321-329.
- [3] 李光辉, 朱德妹, 汪复, 等. 2011 年中国 CHINET 血流感染的病原菌分布及耐药性 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(4): 241-247.
- [4] WESTH H, LISBY G, BREYSSE F, et al. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of blood stream pathogens in patients with suspected sepsis[J]. Clin Microbiol Infect, 2009,

- 15(6): 544-551.
- [5] KUMAR A, ROBERTS D, WOOD K E, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock[J]. *Critical Care Medicine*, 2006, 34(6): 1589-1596.
- [6] 姜莉, 杨洪芬. 浅析影响血液细菌培养阳性率的因素及应对措施 [J]. *当代医药论丛*, 2014, 12(9): 53.
- [7] 高丽钦, 王武军, 甘龙杰, 等. 2011-2013 年临床血培养病原菌的分布及耐药性变迁 [J]. *中国抗生素杂志*, 2015, 40(7): 555-560.
- [8] 徐修礼, 杨春龙, 樊新, 等. 血培养标本中病原菌分布及其耐药性分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2008, 18(10): 1456-1459.
- [9] DRANCOURT M. Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry a review[J]. *Clinical Microbiology Infect*, 2010, 16(11): 1620-1625.
- [10] ANDREW E, CLARK ERIN J, KALE T, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2013, 26(3): 547-603.
- [11] BARBERINO M G, SILVA M O, ARRAES A C P, et al. Direct identification from positive blood broth culture by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)[J]. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2017, 21(3), 339-342.
- [12] DIXON P, DAVIES P, HOLLINGWORTH W, et al. A systematic review of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry compared to routine microbiological methods for the time taken to identify microbial organisms from positive blood cultures[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2015, 34(5): 863-876.
- [13] RIM J H, LEE Y, HONG S K, et al. Insufficient discriminatory power of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry dendrograms to determine the clonality of multi-drug-resistant acinetobacter baumannii isolates from an intensive care unit[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 25: DOI: 10.1155/2015/535027.
- [14] HAMPRECHT A, CHRIST S, OESTREICHER T, et al. Performance of two MALDI-TOF MS systems for the identification of yeasts isolated from bloodstream infections and cerebrospinal fluids using a time-saving direct transfer protocol[J]. *Med Microbiol Immunol*, 2014, 203(2), 93-99.

(童颖丹 编辑)