

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱用于直接鉴定临床病理样本中微生物的研究

刘新海(广东省深圳市龙岗区横岗人民医院检验科 518115)

【关键词】 软电离生物质谱; 微生物; 应用; 检测和鉴定

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.14.032 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)14-1742-03

在临床微生物实验室,鉴定患者样本的微生物长期主要基于检测假定的目标微生物所表现出来的表型特征。革兰染色、菌落形态学、镜检、选择性培养基上的生长情况和各种生化试验是传统鉴定方法的主要手段。因为这些方法一般需依赖于相关微生物的活性代谢过程,因此,一般需要一个较长的培养过程。而临床微生物检测需要对感染患者的检测样本进行快速鉴定以及及时给予适当的对症治疗,所以传统方法明显不能满足临床检测需要。分子诊断方法,主要是 16S 核糖体 RNA 测序或实时 PCR 基因检测方法。经过多年的发展并已被普遍应用于微生物的鉴定,是一种重要的微生物鉴定方法。但是这些方法操作繁杂且相对价格昂贵,同时基于时间和价格的考虑,其并不适用于临床微生物实验室的检测工作。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术作为最新发展起来的一种简便、快速、准确、经济的病原微生物鉴定方法,正好满足临床微生物实验室对病原微生物快速经济的诊断需求。相信随着该方法的发展和在临床微生物实验室的广泛应用,将显著改变现在微生物实验室的工作模式和流程,给临床科研工作人员带来更多便利。

1 基本原理

MALDI-TOF-MS 是近年来发展起来的一种新型的软电离生物质谱。仪器主要由两部分组成:基质辅助激光解吸电离离子源(MALDI)和飞行时间质量分析器(TOF)。MALDI 的原理是用激光照射样品与基质形成的共结晶薄膜,基质从激光中吸收能量传递给生物分子,而电离过程是将质子转移到生物分子或从生物分子得到质子,而使生物分子电离的过程。它是一种软电离技术,适用于混合物及生物大分子的测定。TOF 的原理是离子在电场作用下加速飞过飞行管道,根据到达检测器的飞行时间不同而被检测测定离子的质荷比(M/Z)与离子的飞行时间成正比。MALDI-TOF-MS 再依据样品 m/z 的不同来进行检测,并测得样品的相对分子质量。完整的细胞可以产生特殊的蛋白图谱(指纹图谱),通过和以前收集的数据库中的指纹图谱相比较来鉴定微生物。

2 技术方法

2.1 样品准备 对不同的生物样本有不同的预处理方法,如高浓度的来自患者的血液样本的宿主蛋白会干扰特定的细菌和真菌蛋白的检测。所以样本制备需经过分离细菌和宿主蛋白的细胞溶解以及不同的离心步骤。当样本中细菌的量和当前 MALDI-TOF-MS 方法的检测限不要能满足要求时,一般除了加大血液和尿液的量,还可以对血液进行额外的富集培养。

尿液样本中因为不含有复杂菌群且几乎无宿主蛋白,所以没有血培养物那么相对复杂的预处理过程。虽然来自泌尿道感染的患者的尿液样本的细菌总数一般大于或等于 10^5 CFU/mL,已有许多研究小组直接用 MALDI-TOF 来鉴定尿液中的

菌物^[1-2]。然而,因为进入 MALDI-TOF 的微板的加入量只有 $1\sim 2\ \mu\text{L}$,所以如果直接测量原尿中的菌,鉴定结果会不准确,所以目前已发展多种不同的前处理方法,使用两次连续的离心(低速去除白细胞,高速收集菌体)等。

2.2 样品制备 MALDI-TOF MS 是一种非常灵敏的技术,分析时只需要少量的微生物即可(细菌 $10^4\sim 10^6$ CFU)。鉴定微生物时,样品和 $1\ \mu\text{L}$ 的基质溶剂混合后置于钢制靶盘表面晾干。基质溶剂与样品在靶盘上共结晶。这些基质一般是由在可用的激光波长范围内具有强烈吸收的酸性小分子组成。基质的选择根据待分析的生物分子和激光类型^[3]。最常使用的基质有 2,5-二羟基苯甲酸 DHB、对羟基桂皮酸 CHCA 等。

2.3 MS 典型的靶盘能放置 $16\sim 384$ 个样品。装样后的靶盘插入仪器中然后被转入测量室。质谱仪中必须保持高的真空度。目标样品在真空环境经特定激光照射,激光能量使微生物和基质蒸发,导致核糖体蛋白质离子化。离子在电磁场作用下加速然后进入飞行管。最终精确记录被分析物经过飞行管到达检测器所花的飞行时间。离子化程度和蛋白质量决定了被分析物特定的 TOF。基于这些 TOF 信息,由此产生一个特征性的光谱并组成一个特定的样品指纹图谱,而它对于给定物种是独特的。

2.4 指纹图谱比对 对于物种水平的鉴定,一般使用的大小范围是 $2\sim 20\times 10^3$,因为被发现这个范围内是很稳定和有很强信噪比的,而这个范围正好在核糖体蛋白质离子化效果不错的范围之中,可以提供精确的图谱,同时极少受到微生物生长条件的影响。计算机软件自动比对收集来的图谱和包含多种多样的医学相关菌种图谱的数据库。所测得的图谱具有技术性固有噪声,因此很难有与已知图库中的谱图一致。软件会比对观察值与储存数据谱图之间的相似度从而得出一个数值(分值),这个数值来表示鉴定的有效性。数值大于 2.0 一般被鉴定为同种。数值在 1.7~2.0 之间表示鉴定为同属。当前的算法允许整个计算机分析在一个几乎实时的时间范围内,因此,如果只有一个测试样品的话,可能需要 5~7 min 就可以获得一个物种水平的鉴定。

3 应用

鉴于 MALDI-TOF 技术对病原微生物鉴定的准确性,此技术可以直接应用于一些临床样本,例如血液、尿液、脑脊髓液等。

3.1 血液 血液感染、感染性休克和心内膜炎是一类有很高死亡率和发病率的严重疾病。血液培养物是建立这些感染的病因学信息的最好方法,同时可以指导抗菌治疗。因为快速合适的抗菌治疗对于降低不良后果是很关键的,所以显得其尤为重要。事实上,合适的治疗和不合适的治疗血液感染患者的病死率分别为 20% 和 34%。快速的知道阳性血液培养物的革兰

菌株结果对适应抗菌治疗作用显著。因此,早于革兰鉴定的对阳性血液培养物的微生物的精确鉴定将可能有助于临床医生更好的调整抗菌治疗。

利用分子生物学特别是实时 PCR 直接从阳性血培养物中鉴定细菌已有诸多尝试^[4-5]。目前,许多研究已经报告了 MALDI-TOF-MS 方法对阳性血培养物中微生物的鉴定。相关研究显示,根据革兰阳性还是阴性或者前处理不同,准确性鉴定的范围也有很大的区别,物种水平的准确性鉴定范围在 31.8%~95% 之间。当然这也与目前存在的一些技术性困难有关,如有研究表明单独使用 MALDI-TOF-MS 方法不能完成对某些链球菌的鉴定^[6]。另外,阳性血培养物中非单一菌的鉴定也体现出目前的技术困难^[7-8]。

Stenenson 等^[9]用 MALDI-TOF-MS 和传统方法分别检测了 212 个阳性血培养物。结果显示,212 个中有 170 个阳性培养物得分大于或等于 1.7。42(19.8%) 个的得分小于 1.7,即不能确认鉴定的准确性。在那 170 个得分足够达到鉴定要求的培养物种,162 个可以准确鉴定,大多数(158/162,98%)达到种水平的鉴定,剩余达到属水平的鉴定。所有 8 个错误鉴定都是草绿色链球菌,在得分大于或等于 2.0 的情况下误判为肺炎链球菌。10 个含有多种微生物的血培养物样本中,尽管并未出现错误鉴定,但是 MS 方法不能可靠的鉴定全部出现的微生物。

Prod'hom^[10]发展了一种溶解红细胞的氯化铵方法来进行的 MALDI-TOF-MS 分析,作者经连续 9 周从 78 个患者中收集了 126 份血培养物。其中 4 份多菌培养物被排除。有效鉴定 96/122(78.7%),95 份种水平上的鉴定,尽管事实上只有 69 份得分在 2.0 以上。其余 26 份为不确定性鉴定。整个提取时间平均需要 30~45 min。

Kok^[11]评估了 MALDI Sepsityper™ Kit 平台 MS 方法与传统方法的比较。对 507 个血培养瓶进行了检测,379 个用 MALDI-TOF-MS 方法检测(74.8%,358 单菌,21 多菌),单菌血培养物中革兰阳性菌的属水平和种水平的鉴定率达到 100% 和 67.7%,而革兰阴性菌分别为 100% 和 91.4%。革兰阴性菌种水平的鉴定率明显高于阳性菌。

Blake 等^[12]对 164 株阳性血培养物中微生物进行了检测,能从 85.5% 的单菌阳性血培养物中直接鉴定,与传统方法比较,属水平和种水平的鉴定一致性分别高达 97.6% 和 94.1%。同样,革兰阴性菌的鉴定率(97.8%)要明显高于革兰阳性菌的鉴定率(80.0%)。

Ferronoi 等^[13]直接检测模拟的酵母样菌阳性血培养液中 10 株白色念珠菌和 10 株非白色念珠菌以及 11 株患者血培养标本中的白色念珠菌,鉴定准确率均为 100%。Marinach 等^[14]直接鉴定血培养液中 12 株酵母样菌,属于不同的 6 个种,鉴定准确率为 100%。Yan 等^[15]直接从阳性血培养液中提取和鉴定酵母样菌蛋白也获得了满意结果。

3.2 尿液 分析从琼脂平板上分离的纯培养物一般只需要一个简单的处理过程,鉴定血培养物中的病菌也需要提取和富集的处理程序,最具挑战性的是,直接鉴定患者样本中的病菌而无需经过富集培养过程。这些样本里通常还大量存在宿主蛋白和其他正常菌群,这些都可能影响到目标谱图的分析。尿液样本中因为不含有正常菌群且几乎无宿主蛋白,所以是个理想的选择。更为有利的是,泌尿道感染通常菌群不复杂且感染过程中病菌的含量很高^[1-2]。

Ferreira^[2]比较了 MALDI-TOF-MS 和传统方法对泌尿道

感染的诊断。作者分析了 260 份已通过流式细胞仪标记为阳性的带菌原尿样本。每个样本应用 4 mL 且应用统一的细胞提取程序。为了比较,10 μ L 未浓缩尿液在血琼脂和麦康基培养基上培养以作传统培养分析。有 235 个样本形成了单菌落,直接 MALDI-TOF-MS 分析的效果依赖于原始样本中的菌落总数。其中有 220 份尿样(94%)菌含量大于 10⁵ CFU/mL, MALDI-TOF-MS 鉴定这些样本种水平的一致性有 202/220(91.8%),2 个在属水平(0.9%)。有 14 个被鉴定为不可靠鉴定,即得分小于 1.7。有 2 个分离物识别错误。15 个菌含量少于 10⁵ CFU/mL 的样本,则报道只有一个可靠性鉴定。

Köhling 等^[16]分析了菌含量在 10²~ $\geq$ 10⁵ CFU/mL 等 107 个不同尿液样本,实验结果表明, MALDI-TOF-MS 方法能对菌含量低至 10³ CFU/mL 的尿液样本进行可靠的直接鉴定。不过部分样本由于人 α -防御素的存在而会影响到菌的鉴定。

3.3 脑脊髓液及其他 另外也有研究应用 MALDI-TOF-MS 直接检测和鉴定其他正常无菌液体中的细菌。应用 MALDI 方法检测包括移植养护液、关节液、深部脓疱标本、骨小孔标本用血培养液孵育。但由于在正常体液中感染的细菌的数量少,目前还主要用于检测和鉴定血液和尿液标本。至于脑脊髓液, Nyvang^[17]在 30 min 内成功的鉴定了肺炎球菌,不过,实际上,脑脊髓液的细菌鉴定强烈的受低菌含量和可用测试量的限制,所以其还仍未应用于常规的诊断实验室。

4 结 论

出众的时间和成本优势,使 MALDI-TOF-MS 方法在临床微生物检测领域具有非常广阔的前景。国外已有大量临床实验室将其付诸实践。MALDI-TOF-MS 方法对鉴定细菌、酵母还是其他真菌都是有效的鉴定方法,许多研究也表明其在常规微生物实验室的应用是很有前景的。MALDI-TOF-MS 方法是目前用于阳性血培养物微生物鉴定的发展最快的技术。虽然目前最广泛的应用还是在平板分离的常规细菌的鉴定。然而,其也显示出可以扩大应用范围至对常规方法很难鉴定的真菌和结核杆菌的鉴定。虽然当前对直接鉴定病理样本中的微生物仍有诸多缺陷和难度,如当前的技术需要较高的菌含量且菌成分需单一,但是,相信随着数据库的完备和质谱技术的发展,这些问题都将得到很好的解决。

参考文献

- [1] Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-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 Jun, 2010,48(6):2110-2115.
- [2] Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Munoz-Bellido JL, et al. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method[J]. Clin Microbiol Infect, 2011,17(7):1007-1012.
- [3] Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry[J]. Mass Spectrom Rev, 2001,20(4): 157-171.
- [4] Westh H, Lisby G, Breysse F, et al. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis[J]. Clin Mi-

- crobiol Infect, 2009, 15(6): 544-551.
- [5] Wallet F, Nseir S, Baumann L, et al. Preliminary clinical study using a multiplex real-time PCR test for the detection of bacterial and fungal DNA directly in blood[J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(6): 774-779.
- [6] La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry[J]. PLoS ONE, 2009, 4(11): e8041.
- [7] Christner M, Rohde H, Wolters M, et al. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(5): 1584-1591.
- [8] Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Guerra IP, et al. Microorganisms direct identification from blood culture by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(4): 546-551.
- [9] Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(2): 444-447.
- [10] Prod'homme G, Bizzini A, Durussel C, et al. MALDI-TOF mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1481-1483.
- [11] Kok J, Thomas LC, 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.
- [12] Blake W, Buchan M, Riebe A, et al. Comparison of the MALDI biotyper system using sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(2): 346-352.
- [13] Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, et al. Real-time identification of bacteria and Candida species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(5): 1542-1548.
- [14] Marinach-Patrice C, Fekkar A, Atanasova R, et al. Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry[J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8862.
- [15] Yan Y, He Y, Maier T, et al. Improved identification of yeast species directly from positive blood culture media by combining sepsityper specimen processing and microflex analysis with the matrix-assisted laser desorption ionization biotyper system[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(7): 2528-2532.
- [16] Köhling HL, Bittner A, Müller K D, et al. Direct identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as interfering factors[J]. J Med Microbiol, 2012, 61(3): 339-344.
- [17] Nyvang Hartmeyer G, Kvistholm Jensen A, Bøcher C, et al. Mass spectrometry: Pneumococcal meningitis verified and Brucella species identified in less than half an hour[J]. Scand J Infect Dis, 2010, 42(9): 716-718.

(收稿日期: 2012-03-24)

高龄患者股骨转子间骨折治疗的选择

胡 杨(重庆医科大学附属第一医院骨(2)科 400016)

【关键词】 高龄患者; 股骨转子间骨折; 治疗

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.14.033 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)14-1744-03

股骨转子间骨折是指股骨颈基底至小转子水平以上的骨折, 位于股骨干-颈的交界处, 主要由松质骨构成, 是承受剪切应力较大的部位, 其机械强度受骨质疏松的影响较大, 因此多见于老年人^[1]。早期倾向于保守治疗, 但近年来越来越多的学者发现, 保守治疗并发症多, 护理困难及功能恢复差, 且病死率高于手术治疗^[2], 因此手术治疗高龄患者股骨转子间骨折成为目前首选治疗方式。下面就治疗方式分为保守治疗、外固定、和内固定进行分别阐述。

1 保守治疗

股骨粗隆间骨折患者大多为高龄老人, 大部分患者入院时合并有呼吸系统及心、脑血管系统等内科疾病。国内董纪元等^[3]研究表明老年髋部骨折患者并存内科疾病者占 75.2%~95.0%, 在创伤应激反应下很有可能使原有疾病加重, 有文献报道高龄组牵引治疗的病死率为 34.6%^[4], 在术后功能恢复方面, 国内早期研究表明, 采取保守治疗有 50% 的患者能生活自理, 其中仅 25% 完全恢复受伤前功能水平^[5], 因此在选择保

守治疗股骨粗隆间骨折时一定要慎重, 重视治疗早期对患者的内科并发症的诊断和治疗, 加强与内科医生的合作, 加强对患者的护理。同时还可以在保证稳定牵引的情况下允许患者在床上做一些必要的身体锻炼。鼓励患者深呼吸, 咳嗽排痰, 以减少坠积性肺炎等并发症的发生。此外还应注意患肢按摩、股四头肌的舒缩锻炼及膝、踝关节的主动活动, 促进肢体的静脉回流, 以减少深静脉血栓形成、关节僵硬和肌肉萎缩的发生。

2 外固定

2.1 概述 外固定支架在国内外有很多类型, 例如我国的潘伟新等^[6]研制的双螺旋加压钉柱角外固定支架, 赵杰等^[7]采用单侧成角度进针外固定器, 谷福顺等^[8]采用的单臂外固定支架治疗粗隆间骨折, 均取得了较满意的效果。目前国内外学者^[9-12]多推荐使用单边外固定支架结合普通外固定针治疗转子间骨折。

2.2 并发症及其预防和治疗 尽管外固定支架在转子间骨折的治疗中拥有手术时间短, 创伤小, 操作简单等优点, 但临床仍