

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.17.001

皂素处理联合 MALDI-TOF MS 直接鉴定血培养阳性病原菌*

张 蓓,赵丽娜,韩清珍,毛菊珍,张有涛,张险峰,何 军,徐 杰[△],史进方[▲]

(苏州大学附属第一医院临床检测中心,江苏苏州 215006)

摘要:目的 评估皂素处理联合基质辅助激光解析电离飞行时间(MALDI-TOF MS)直接鉴定血培养阳性病原菌的可行性,以及比较与传统血培养联合 MALDI-TOF MS 法鉴定结果的符合率。方法 共收集阳性血培养标本 240 例,使用皂素处理方法裂解血细胞富集和纯化待测菌,采用 MALDI-TOF MS 对待测标本进行菌种鉴定,同时阳性血培养瓶也转移接种至血平板进行培养,纯菌落同样用 MALDI-TOF MS 鉴定菌种。结果 240 例阳性血培养瓶有 197 例真阳性瓶和 43 例假阳性瓶。在 193 例单菌株感染血培养瓶中,菌株的鉴定符合率为 69.9%。其中 75 例革兰阴性杆菌的鉴定率为 84.0%;65 例葡萄球菌属的鉴定率分别为 78.5%;10 例肠球菌属的鉴定率为 80.0%。43 例假阳性报警血培养瓶的鉴定符合率为 86.0%。结论 皂素提取联合 MALDI-TOF MS 可作为一种快速鉴定血流感染常见菌的有效方法,有较高的鉴定符合率,且成本低廉,可为临床快速、合理选用抗菌药物提供依据。

关键词:皂素; 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱; 血培养; 直接鉴定**中图分类号:**R446**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2018)17-2525-04

Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using a saponin method*

ZHANG Bei, ZHAO Lina, HAN Qingzhen, MAO Juzhen, ZHANG Youtao,

ZHANG Xianfeng, HE Jun, XU Jie[△], SHI Jinfang[▲]

(Center for Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Suzhou

University, Suzhou, Jiangsu 215006, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the feasibility of the direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using a saponin method. **Methods** A total of 240 cases with positive blood cultures were included in this study. The microorganisms were enriched and purified from positive blood cultures by the saponin-based extraction method, and then the microorganisms were identified by MALDI-TOF MS system. At the same time, the microorganisms were transferred and cultured in blood agar plate, and the pure colony was also identified by MALDI-TOF MS system. **Results** The composition of 240 positive blood culture bottles were 197 true positive and 43 false positive blood culture bottles. For 193 monomicrobial blood cultures, the identification rate by MALDI-TOF MS using a saponin method was 69.9%. For 75 cases of gram-negative bacillus among them, the identification rate were 84.0%, and for 65 cases of Staphylococcus, the identification rate were 78.5%; and the rate of Enterococcus was 80.0% (8/10). The coincidence rate was 86.0% to 43 cases positive alarm of Biphase Blood Culture. **Conclusion** The method by MALDI-TOF MS using a saponin method is effective in rapidly identifying common bloodstream infection microorganisms with a higher identification rate. Furthermore, it is less expensive and provides evidences for quick and rational use of antibiotics.

Key words: saponin; MALDI-TOF MS; blood culture; direct identification

近年来,经验性广谱抗菌药物的使用和侵入性诊疗等危险因素的增多,使血流感染日益成为患者院内致残和致死的主要病因^[1-2]。充分利用先进的微生物鉴定仪以缩短血流感染鉴定时间,指导临床及时开展病原菌针对性治疗使患者预后良好具有重要意义^[3-6]。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MAL-

DI-TOF MS)因能准确、快速地检测血培养中病原菌而在微生物实验室广泛使用^[7-9]。与传统鉴定方法比较,直接鉴定阳性血培养有利于败血症患者得到更早、更有效的治疗^[10-13]。本研究采用皂素处理阳性血培养液,使病原菌富集并纯化,然后利用 MALDI-TOF MS 对病原菌蛋白谱图进行鉴定分析,同时报道

* 基金项目:国家自然科学基金青年项目(81501425);江苏省卫生和计划生育委员会医学科研项目(Q201401);江苏省青年医学人才项目(QNRC2016726)。

作者简介:张蓓,女,在职研究生,主要从事临床细菌耐药与致病机制研究。 [△] 通信作者, E-mail: xuj2007@lzu.edu.cn。 [▲] 通信作者, E-mail: 765961637@qq.com。

阳性的血培养瓶进行传统培养流程,培养的纯菌落也使用 MALDI-TOF MS 进行鉴定,若两者结果不一致,以后者为准。

1 材料与方法

1.1 一般材料 收集 2016 年 11 月至 2017 年 1 月苏州大学附属第一医院 240 例血培养仪器报警患者(388 例阳性仪器报警血培养瓶)标本,标本类型包括全血、静脉导管血。

1.2 仪器与试剂 Bact/ALERT® 3D 全自动血培养仪及其配套的血培养需氧微生物培养瓶(SA)和厌氧兼性厌氧微生物培养瓶(SN)均购自梅里埃(中国)公司。48 孔靶板和 α-氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)(α-氰基-4-羟基肉桂酸)基质液购自梅里埃(中国)公司。皂素、甲酸和乙腈购自美国 Sigma-Aldrich 公司。质控校准菌株 ATCC 8739 由梅里埃(中国)公司提供。

1.3 皂素提取法 MALDI-TOF MS 直接鉴定 生物安全柜内操作,采用 2 mL 无菌注射器提取 800 μL 仪器报警血培养液于含 500 μL 4%皂素的 1.5 mL 离心管中颠倒混匀,室温放置 3~5 min;10 000 r/min 离心 2 min,弃上清液;加入 600 μL 0.9%生理盐水重悬沉淀,取 1 滴悬液涂片革兰染色镜检;再次 10 000 r/min离心 2 min,弃上清液;加入 60 μL 70%甲酸(现用现配),微量加样枪重悬混匀沉淀,室温放置 3~5

min;加入 60 μL 乙腈,颠倒混匀,室温放置 3~5 min,提取菌体蛋白;10 000 r/min 离心 2 min;吸取 2 μL 上清液加至 Vitek MS 金属靶板孔,每个标本重复 2 孔,室温干燥;每孔加 0.9 μL CHCA 基质液,室温干燥。根据革兰染色涂片结果选择细菌和真菌进行质谱分析。

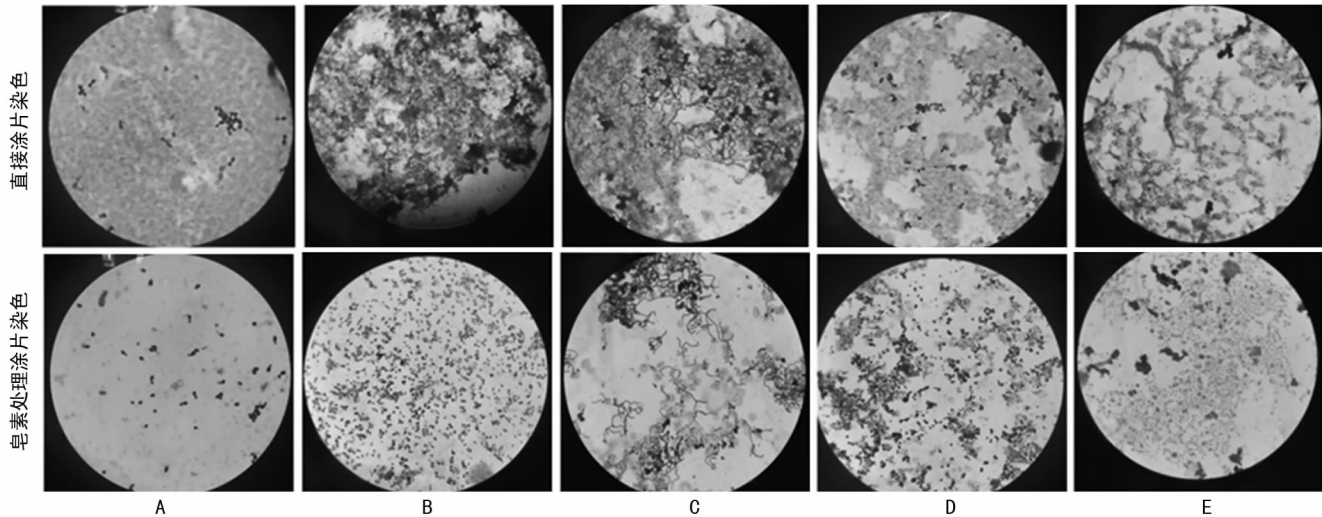
1.4 血培养直接涂片与皂素处理后涂片染色镜检

(1)直接涂片染色镜检:从血培养仪中取出报警血培养瓶,涂片革兰染色镜检,记录是否存在微生物及其革兰染色性和菌体形态。(2)皂素处理后涂片染色镜检:取 1 滴皂素裂解红细胞处理后 0.9%生理盐水重悬菌液涂片革兰染色镜检。

1.5 传统血培养 MALDI-TOF MS 鉴定 血培养阳性标本转种于血琼脂平板,适宜环境中孵育 18~72 h,若初次培养未见细菌生长,72 h 后再次转种血培养阳性标本;挑取单菌落,涂布金属靶板孔中,采用 Vitek MS 微生物质谱鉴定系统进行鉴定。

2 结果

2.1 血培养直接涂片与皂素处理后涂片染色镜检结果比较 血培养直接涂片存在大量红细胞背景,存在难以区分革兰阴性杆菌与血细胞背景,以及过度染色、脱色等问题。皂素处理后涂片染色镜检时,镜下观察背景清晰,干扰较少,细菌革兰染色性和菌体形态典型,很容易找到革兰阴性杆菌。见图 1。



注:A 表示念珠菌;B 表示阳性杆菌;C 表示阴性杆菌;D 表示阳性球菌;E 表示阴性球菌

图 1 直接涂片与皂素处理涂片镜检图片比较

2.2 皂素处理-质谱法直接鉴定血培养的微生物结果

2.2.1 单菌株血培养共 193 例(剔除同一患者多例标本),标本皂素处理-质谱法直接鉴定的符合率为 69.9%(135/193)。革兰阴性杆菌的符合率为 84.0%(63/75),错误率为 4.0%(3/75)。葡萄球菌属的符合率为 78.5%(51/65),错误率为 6.2%(4/65)。肠球菌属的符合率为 80.0%(8/10),错误率为 10.0%(1/10)。链球菌属的符合率为 23.1%(3/13),错误率为 23.1%(3/13),未鉴定率为 53.8%(7/13)。阳性杆菌的符合率为 11.8%(2/17),未鉴定率为 82.4%

(14/17)。念珠菌属的符合率为 66.7%(4/6);厌氧菌的符合率为 100.0%(3/3)。见表 1。

表 1 单菌株血培养病原菌鉴定结果[n(%)或 n]

病原菌	菌株数(n)	质谱直接鉴定	未鉴定	鉴定错误
革兰阴性杆菌	75	63(84.0)	9(12.0)	3(4.0)
肺炎克雷伯菌	26	22	4	0
大肠埃希菌	23	21	2	0
鲍曼不动杆菌复合群	9	7	0	2
铜绿假单胞菌	7	7	0	0
阴沟肠杆菌	3	2	1	0
产气肠杆菌	1	1	0	0

续表 1 单菌株血培养病原菌鉴定结果[n(%)或 n]				
病原菌	菌株数(n)	质谱直接鉴定	未鉴定	鉴定错误
产酸克雷伯菌	1	1	0	0
木糖氧化无色杆菌	1	0	1	0
溶血不动杆菌	1	0	0	1
少动鞘氨醇单胞菌	1	1	0	0
嗜麦芽窄食单胞菌	1	1	0	0
洋葱伯克霍尔德菌	1	0	1	0
葡萄球菌属	65	51(78.5)	10(15.4)	4(6.2)
人葡萄球菌人亚种	20	19	1	0
表皮葡萄球菌	17	13	2	2
金黄色葡萄球菌	9	7	2	0
溶血葡萄球菌	7	6	1	0
头状葡萄球菌	6	5	1	0
科氏葡萄球菌	2	1	1	0
腐生葡萄球菌	1	0	0	1
木糖葡萄球菌	1	0	1	0
沃氏葡萄球菌	1	0	1	0
中间葡萄球菌	1	0	0	1
肠球菌属	10	8(80.0)	1(10.0)	1(10.0)
屎肠球菌	5	4	1	0
粪肠球菌	3	3	0	0
鹌鸡肠球菌	1	0	0	1
小肠肠球菌	1	1	0	0
链球菌属	13	3(23.1)	7(53.8)	3(23.1)
戈登链球菌	4	0	3	1
咽峡炎链球菌	3	1	2	0
肺炎链球菌	1	0	1	0
解没食子酸盐链球菌	1	1	0	0
毗邻颗粒链球菌	1	0	0	1
托尔豪特链球菌	1	0	0	1
血链球菌	1	1	0	0
草绿色链球菌	1	0	1	0
阳性杆菌	17	2(11.8)	14(82.4)	1(5.9)
棒状杆菌属	17	2	14	1
念珠菌属	6	4(66.7)	1(16.7)	1(16.7)
近平滑念珠菌	2	0	1	1
热带念珠菌	2	2	0	0
白色念珠菌	1	1	0	0
克柔念珠菌	1	1	0	0
厌氧菌	3	3(100.0)	0	0
缺陷乏养菌	2	2	0	0
脆弱拟杆菌	1	1	0	0
少见菌	4	1(25.0)	2(50.0)	1(25.0)
布鲁氏菌	2	0	1	1
奥斯陆莫拉菌	1	1	0	0
人型支原体	1	0	1	0
合计	193	135(69.9)	44(22.8)	14(7.3)

2.2.2 多菌株阳性血培养瓶共 4 例(剔除同一患者多例标本),仅有 2 例鉴定出其中的 1 种病原菌;2 例未鉴定出病原菌。

2.2.3 240 例仪器报警血培养瓶中有 43 例是培养阴性的标本,有 37 例鉴定结果与血培养结果一致,符合

率为 86.0%(37/42);其余 6 例鉴定为少见菌:堪萨斯分枝杆菌 2 例、格氏李斯特菌 1 例、玫瑰色库克菌 1 例、弯曲乳杆菌 1 例、生孢梭菌 1 例。

3 讨 论

本研究采用皂素裂解血培养瓶中红细胞及其他操作步骤进行富集并纯化菌体蛋白质,排除因血培养瓶中除有细菌外,还有人体血细胞、肉汤营养成分甚至树脂等干扰因素对后续质谱结果的影响^[14]。与此法类似的有 Sepsityper 配套试剂盒,但是成本昂贵^[15-16]。

本研究结果表明,皂素处理-质谱法在单菌株阳性瓶革兰阴性杆菌、葡萄球菌属、肠球菌属、厌氧菌的鉴定符合率达 75.0%以上,而且其相对于传统的培养鉴定流程可提前 1~2 d 鉴定结果,可以在血培养仪器报警的 1~2 h 内将病原菌鉴定结果报告临床。有研究报道,有效的抗菌药物治疗每延迟 1 h,感染性休克患者出现低血压后的存活率平均下降 7.6%,所以该方法对血流感染患者的治疗意义重大^[-3]。本方法鉴定符合率(69.9%)与分离胶促凝管联合 MALDI-TOF MS 方法的鉴定符合率(73.6%)基本一致,说明本研究方法的可行性^[17]。但是还存在一些不足,链球菌属与阳性杆菌的鉴定符合率明显低于其他病原菌的鉴定,李媛睿等^[18]对可能原因进行了分析:(1)革兰阳性球菌细胞壁结构相对较厚,不易裂解,提取的核糖体蛋白浓度不够。(2)蛋白结构高度相似,特征性峰谱较少,质谱难以区分。(3)生长缓慢,核糖体蛋白未充分表达。(4)菌体形态小,未能提取足够的蛋白。(5)某些患者血细胞压积过高,使抽取的血培养液的含量与皂素含量未达到一定比例,因此红细胞裂解不充分,干扰了鉴定结果。本研究更倾向于 MALDI-TOF MS,由于其本身对链球菌属与阳性杆菌的数据库并不完善,限制了其鉴定。多菌株感染血培养瓶中,有 2 例鉴定出其中的 1 种病原菌;2 例未鉴定出病原菌;虽然可以鉴定出其中 1 种,但是其鉴定率不高,复合菌均鉴定的比率更低,原因可能为 2 种菌体的核糖体蛋白互相干扰^[19]。43 例假阳性血培养瓶中,37 例与传统鉴定结果一致,6 例用皂素提取法联合 MALDI-TOF MS 鉴定出细菌,种类有堪萨斯分枝杆菌 2 例、格氏李斯特菌 1 例、玫瑰色库克菌 1 例、弯曲乳杆菌 1 例、生孢梭菌 1 例。这些细菌大多在自然环境和水中广泛存在,可能在操作过程中污染了这些菌,也可能是血培养瓶在抽取血液时被这些菌污染,由于数量少,传统鉴定方法未能鉴定出,因而出现结果不一致。所以,对鉴定出来的结果,还要参考革兰染色镜检结果进行综合评价。

与传统鉴定方法相比,皂素预先处理与 MALDI-TOF MS 联合有以下优点:(1)直接提取,操作简便。(2)检测快速,周转时间短,每份标本约为 15~20 min。(3)鉴定范围广,基本涵盖临床常见病原菌。(4)结合革兰染色镜检结果,对临床治疗有重要的提

示意义。有待改进的地方:(1)链球菌和阳性杆菌的鉴定率不高。(2)鉴定易受标本血细胞压积过高的干扰,可适当减少血培养液含量。(3)慢生长的细菌,存在菌含量不够的限制,菌量至少达到 10^6 CFU/mL 才能获得较好的质谱峰^[20]。

综上所述,采用皂素处理联合 MALDI-TOF MS 能快速、简便、准确地鉴定血培养的常见病原菌,且成本低廉,可行性高,适合在临床微生物实验室推广应用;同时满足临床对血流感染病原菌快速诊断的需求,临床医师可结合该院耐药性检测数据,及时对血流感染患者给予早期且有效的抗菌药物治疗,从而降低患者的院内致残率和致死率。

参考文献

- [1] BEARMAN G M, WENZEL R P. Bacteremias; a leading cause of death[J]. Arch Medl Res, 2005, 36(6): 646-659.
- [2] GAIESKI D F, MIKKELSEN M E, BAND R A, et al. Impact of time to antibiotics on survival in patients with severe sepsis or septic shock in whom early goal-directed therapy was initiated in the emergency department[J]. Crit Care Med, 2010, 38(4): 1045-1053.
- [3] 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.
- [4] STONEKING L R, PATANWALA A E, WINKLER J P, et al. Would earlier microbe identification alter antibiotic therapy in bacteremic emergency department patients? [J]. J Emerg Med, 2013, 44(1): 1-8.
- [5] TIAN Y, ZHENG B, WANG B, et al. Rapid identification and multiple susceptibility testing of pathogens from positive-culture sterile body fluids by a combined MALDI-TOF mass spectrometry and vitek susceptibility system [J]. Front Microbiol, 2016, 7(2): 523-525.
- [6] YEON P S, JUNG L E, TARK K, et al. Early administration of appropriate antimicrobial agent to improve the outcome of carbapenem resistant acinetobacter baumannii complex bacteremic pneumonia[J]. Int J Antimicrob Ag, 2017, 579(17): 30391-30396.
- [7] HELENE P, SOPHIE D, MATTHIEU E, et al. Using vitek MALDI-TOF mass spectrometry to identify species belonging to the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex: a relevant alternative to molecular biology? [J]. Diagn Microbiol Infec Dis, 2015, 83(2): 99-104.
- [8] KIM Y J, SI H K, PARK H J, et al. MALDI-TOF MS is more accurate than VITEK II ANC card and API rapid ID 32 A system for the identification of clostridium species[J]. Anaerobe, 2016, 40(8): 73-75.
- [9] FARON M L, LEDEBOER N A. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for use with positive blood cultures: methodology, perform-

ance, and optimization[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(12): 3328-3338.

- [10] LAGACE-WIENS P R, ADAM H J, KARLOWSKY J A, et al. Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: analysis of performance, cost, and turnaround time[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(10): 3324-3328.
- [11] GALAR A, LEIVA J, ESPINOSA M, et al. Clinical and economic evaluation of the impact of rapid microbiological diagnostic testing[J]. J Infect, 2012, 65(4): 302-309.
- [12] 上海医学会检验医学专科委员会临床微生物学组. 上海地区阳性血培养直接质谱快速检测规范[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(3): 165-168.
- [13] BAZZI A M, RABAAN A A, EL E Z, et al. Comparison among four proposed direct blood culture microbial identification methods using MALDI-TOF MS [J]. J Infect Public Health, 2016, 10(3): 308-315.
- [14] MEEEX C, NEUVILLE F, DESCY J, et al. Direct identification of bacteria from BacT/ALERT anaerobic positive blood cultures by MALDI-TOF MS: MALDI sepsityper kit versus an in-house saponin method for bacterial extraction[J]. J Med Microbiol, 2012, 50(11): 1511-1516.
- [15] 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.
- [16] YONETANI S, OHNISHI H, OHKUSU K, et al. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method[J]. International Journal of Infectious Diseases Ijidd Official Publication of the International Society for Infectious Diseases, 2016, 52(4): 37-42.
- [17] 陈峰, 李媛睿, 皇甫昱婵, 等. 分离胶促凝管联合 MALDI-TOF MS 直接检测血培养阳性细菌[J]. 检验医学, 2015, 30(2): 113-121.
- [18] 李媛睿, 俞静, 刘婧娴, 等. 应用 MSK 试剂盒-质谱法直接鉴定阳性血培养标本[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2016, 36(2): 256-263.
- [19] KOHLMANN R, HOFFMANN A, GEIS G, et al. MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures[J]. Int J Med Microbiol, 2015, 305(4/5): 469-479.
- [20] STEVENSON L G, DRAKE S K, MURRAY P R. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(8): 444-447.