

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.24.014

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术在尿标本微生物快速鉴定中的应用*

许荣琴¹, 杜 鸿², 谢小芳², 郭 敏², 周惠琴^{2△}

(1. 苏州市第七人民医院检验科, 苏州 215151; 2. 苏州大学附属第二医院检验科, 苏州 215004)

摘要:目的 评估基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术在尿液标本微生物快速鉴定中的临床应用价值。**方法** 收集苏州大学附属第二医院 2016 年 10—12 月住院和门诊送检的中段尿标本进行差速离心沉淀后经 MALDI-TOF MS 技术检测, 同时进行尿常规和有形成分分析, 并与传统尿培养鉴定结果进行比较, 计算质谱的鉴定率。**结果** 212 例尿培养阳性标本中 MALDI-TOF MS 技术鉴定出病原菌 168 例, 总鉴定率为 79.2%, 大肠埃希菌鉴定率最高, 为 92.0%, 其他肠杆菌科细菌、肠球菌属、非发酵菌科鉴定率分别为 79.4%、66.5%、66.7%, 假丝酵母菌属、链球菌属、其他革兰阳性菌标本量少, 鉴定率分别为 58.3%、50.0%、44.4%。其中 140 例标本菌落计数大于 10^5 CFU/mL, 鉴定率为 92.9%。**结论** MALDI-TOF MS 技术直接检测尿液标本中的微生物具有简单快速、准确性高等优点, 可以弥补传统方法的不足, 有效缩短检验时间, 优化实验室流程, 准确快速地为临床提供检验结果, 结合尿常规和有形成分分析等辅助手段具有较高的临床应用价值。

关键词:基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术; 快速鉴定; 差速离心; 中段尿培养

中图法分类号: R372

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)24-3694-04

Application of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the rapid identification of microorganisms in urine*

XU Rongqin¹, DU Hong², XIE Xiaofang², GUO Min², ZHOU Huiqin^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Seventh People's Hospital of Suzhou, Suzhou, Jiangsu 215151, China;

2. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Soochow

University, Suzhou, Jiangsu 215004, China)

Abstract: Objective To examine the clinical value of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) for the rapid identification of microorganisms in urine. **Methods** Medium urine samples collected from the Second Affiliated Hospital of Suzhou University from October to December 2016 were detected by MALDI-TOF MS after differential centrifugal precipitation. Urine routine and constituent analysis were carried out. The results were compared with those of traditional urine culture. The identification rate of mass spectrometry was calculated. **Results** Among 212 positive samples of urine culture, 168 cases were identified by MALDI-TOF MS, with a total identification rate of 79.2%. The identification rate of *Escherichia coli* was the highest (92.0%). The identification rates of other enterobacteriaceae, *Enterococcus* and non-fermentative bacteria were 79.4%, 66.5% and 66.7%, respectively. *Candida*, *Streptococcus* and other Gram-positive bacteria were few. The identification rates were 58.3%, 50.0% and 44.4% respectively. The colony count of 140 samples was more than 10^5 CFU/mL, and the identification rate was 92.9%. **Conclusion** Direct detection of microorganisms in urine samples by MALDI-TOF MS technology has the advantages of simplicity, rapidity and high accuracy. It can make up for the shortcomings of traditional methods, effectively shorten the testing time, optimize the laboratory process, accurately and quickly provide the clinical test results. It has relatively high clinical application value as it can combine auxiliary means such as urine routine and organic component analysis.

Key words: MALDI-TOF MS; rapid identification; differential centrifugation; urine culture

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI- TOF MS)技术是近年来新兴的细菌鉴定技术, 它的

* 基金项目: 江苏省科技厅重点研发项目(BE2017654); 苏州市临床微生物重点实验室资助项目(SZ201715)。

作者简介: 许荣琴, 女, 技师, 主要从事微生物检验方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: zhouhuiqinfey@126.com。

出现在微生物实验室掀起了一场病原体鉴定的革命,被认为是鉴定细菌最有效的方法,具有准确快速和成本低等传统方法不可比拟的优势,尤其对于一些微需氧菌、厌氧菌和分枝杆菌的鉴定^[1-7]。目前, MALDI-TOF MS 技术主要应用于临床各种送检标本分离培养后单菌落的检测,本实验室利用质谱技术直接鉴定血流感染中的病原菌取得了较好的效果,可为临床血流感染的及时诊治提供有效可行的实验室检测手段^[8-9]。而由于其他无菌部位的标本,如尿液、脑脊液等因细胞或蛋白干扰,质谱直接检测受到限制。目前临床诊断尿路感染除了结合临床表现,主要依靠传统的尿培养及尿常规和尿液有形成分分析,尿培养细菌鉴定耗时长,尿常规和有形成分分析通常是作为快速筛查试验。为了能够快速准确地对中段尿进行细菌鉴定,本文对 MALDI-TOF MS 技术在尿液标本微生物快速鉴定中的应用价值进行评估,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2016 年 10—12 月苏州大学附属第二医院住院和门诊送检的清洁中段尿标本。

1.2 仪器与试剂 采用无菌生理盐水、哥伦比亚血琼脂平板、甲酸、CHCCA 基质液、KDC-40 低速离心机、SIGMA 高速离心机、MALDI BioTyper 质谱仪(德国布鲁克公司)、PhoenixTM-100 自动化微生物鉴定仪、AUTION MAX AX-4280 尿常规分析仪、UF-1000i 全自动尿有形成分分析仪等。

1.3 方法

1.3.1 标本前处理 中段尿标本混匀后取 6 mL 于无菌试管中,3 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加 1 mL 无菌生理盐水,混匀后 500 r/min 离心 5 min,吸上清液于无菌 EP 管中以 5 000 r/min 离心 5 min,弃上清液留沉淀待用。

1.3.2 质谱检测 将 EP 管中沉淀混匀成悬液,取 1 μ L 均匀涂布于 MS 靶板,干燥后取 1 μ L 甲酸覆盖,再干燥后取 1 μ L 基质液覆盖,最后干燥后经 MALDI BioTyper 质谱仪检测,记录结果。

1.3.3 革兰染色镜检 将 EP 管中剩余沉淀混匀,取适量涂片革兰染色镜检,观察镜下细菌浓度及杂质情况并记录。

1.3.4 尿常规和尿液有形成分分析 将尿标本采用 AUTION MAX AX-4280 尿常规分析仪及 UF-1000i 全自动尿有形成分分析仪进行尿常规和有形成分分析,并记录结果。

1.3.5 标本培养与鉴定 取 10 μ L 尿标本于血琼脂平板上连续划线,置 35 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱中过夜培养,取培养阳性标本的菌落经 PhoenixTM-100 自动化微生物鉴定仪鉴定,鉴定仪无法鉴定的则取单菌落进行质谱鉴定,记录结果。将直接质谱鉴定结果与培养结果进行比较,以培养结果为标准,计算直接质谱法的鉴定率。

2 结果

2.1 传统尿培养与直接质谱检测与尿常规和尿有形成分分析结果比较 所有标本中培养阳性 212 例,培养出一种菌的标本 201 例,直接质谱鉴定率为 78.6%,其中大肠埃希菌检出率最高,为 92.0%,培养出两种菌的标本 11 例,直接质谱鉴定率为 90.9%,但只有 2 例直接质谱鉴定出两种菌,8 例只鉴定出其中比例较大的细菌,另外有 2 例标本培养结果分别为副流感嗜血杆菌和阴道加德纳菌,而直接质谱鉴定结果相应为大肠埃希菌和普通变形杆菌,这与传统培养结果不符,直接质谱鉴定率记为 0.0%,见表 1。

表 1 传统尿培养、直接质谱检测与尿常规和尿有形成分分析结果比较

菌种	培养阳性数(n)	MALDI-TOF MS 鉴定率(%)	亚硝酸盐阳性率(%)	白细胞酯酶阳性率(%)	细菌阳性率(%)
大肠埃希菌	100	92.0	78.0	84.0	80.0
肠球菌属	29	65.5	27.6	37.9	37.9
非发酵菌科	9	66.7	0.0	33.3	77.8
链球菌属	6	50.0	0.0	33.3	50.0
其他肠杆菌科	34	79.4	70.6	67.6	70.6
假丝酵母菌属	12	58.3	0.0	0.0	25.0
其他革兰阳性菌	9	44.4	0.0	0.0	44.4
混合感染	11	90.9	54.5	45.5	66.7
副流感嗜血杆菌	1	0.0	0.0	0.0	0.0
阴道加德纳菌	1	0.0	0.0	0.0	0.0
合计	212	79.2	54.7	60.4	65.1

2.2 标本菌落数对应鉴定率统计结果 见表 2。除 11 例培养出两种菌的标本及 1 例副流感嗜血杆菌和 1 例阴道加德纳菌外,其他 7 种类别均显示规律性。即标本的菌量越多则直接质谱鉴定率越高,对于最常引起尿路感染的大肠埃希菌和肠球菌属,若菌落计数 $>10^5$ CFU/mL,则质谱鉴定率高达 97.6% 以上。

表 2 标本菌落计数对应鉴定率统计

菌种	菌落计数 (CFU/mL)	培养阳性 菌株数(n)	直接质谱 鉴定数(n)	区间检出率 (%)
大肠埃希菌	$>10^5$	82	80	97.6
	$10^4 \sim 10^5$	16	14	87.5
	$<10^4$	2	0	0.0
肠球菌属	$>10^5$	12	12	100.0
	$10^4 \sim 10^5$	11	6	54.5
	$<10^4$	6	1	16.7
非发酵菌科	$>10^5$	6	6	100.0
	$10^4 \sim 10^5$	2	0	0.0
	$<10^4$	1	0	0.0
链球菌属	$>10^5$	4	3	75.0
	$10^4 \sim 10^5$	1	0	0.0
	$<10^4$	1	0	0.0
其他肠杆菌科	$>10^5$	27	23	85.2
	$10^4 \sim 10^5$	7	5	71.4
	$<10^4$	0	0	0.0
假丝酵母菌属	$>10^5$	6	4	66.7
	$10^4 \sim 10^5$	4	2	50.0
	$<10^4$	2	1	50.0
其他革兰阳性菌	$>10^5$	3	2	66.7
	$10^4 \sim 10^5$	4	1	25.0
	$<10^4$	2	0	0.0

2.3 质谱中不同鉴定分值含义 0.000~1.699 没有可信的鉴定结果, $>1.699 \sim 1.999$ 鉴定到属的水平, $>1.999 \sim 2.299$ 鉴定到种的水平, $>2.299 \sim 3.000$ 完全可靠地鉴定到种的水平。本研究各种细菌质谱分值分布见表 3。对于大肠埃希菌,除了 2 例培养结果为大肠埃希菌而直接质谱分别鉴定为阴沟肠杆菌和肺炎克雷伯菌以外,当直接质谱分值 ≥ 1.5 时就已经和传统培养结果一致,说明对于大肠埃希菌直接质谱鉴定分值 ≥ 1.5 时可信度已经较高,由此可见尿液直接质谱鉴定对大肠埃希菌的鉴定尤为可靠,其次为其他肠杆菌科和肠球菌属,质谱分值 ≥ 1.7 的比例分别为 77.8%、57.9%。此外,11 例混合感染标本中质谱鉴定出 10 例,鉴定率达 90.9%,但是仅 2 例两种菌均鉴定出,且质谱结果分值均小于 1.7,可信度不高,其他 8 例则是菌种所占比例较高的被鉴定出,质

谱结果分值 ≥ 1.7 的比例为 87.5%,其中如若菌种所占比例相同,则肠杆菌科细菌和肠球菌属优先被检出,非发酵菌科如铜绿假单胞菌则不能被检出。

表 3 质谱鉴定结果准确性统计

菌种	质谱结果分值区间	株数	比率(%)
大肠埃希菌	≥ 1.5	86	93.5
	< 1.5	6	6.5
肠球菌属	≥ 1.7	11	57.9
	< 1.7	8	42.1
非发酵菌科	≥ 1.7	1	16.7
	< 1.7	5	83.3
链球菌属	≥ 1.7	0	0.0
	< 1.7	3	100.0
其他肠杆菌科	≥ 1.7	21	77.8
	< 1.7	6	22.2
假丝酵母菌属	≥ 1.7	1	14.3
	< 1.7	6	85.7
其他革兰阳性菌	≥ 1.7	0	0.0
	< 1.7	4	100.0

3 讨论

比较尿常规和有形成分分析结果发现,亚硝酸盐、白细胞酯酶、细菌三者总体阳性率均不及 MALDI-TOF MS 的鉴定率,由此可见 MALDI-TOF MS 鉴定的优势,快速、准确率又高。鉴定出的大肠埃希菌和其他肠杆菌科细菌与亚硝酸盐、白细胞酯酶、细菌这三者有一定相关性,符合率达 70.6%~84.0%,准确性较高,因此,尿常规和有形成分分析可以作为辅助检测手段共同服务于临床,其他菌属和假丝酵母菌属数量少,阳性率不高,不可信。

在 MALDI-TOF MS 检测的同时对差速离心获取的沉淀进行革兰染色镜检发现,差速离心法并不能完全保证病原菌与细胞和杂蛋白等彻底分离,带有杂质的标本悬液可能造成质谱分值降低,鉴定不出或菌种错判。目前临床引起尿路感染的病原菌相对比较单一,以大肠埃希菌和肠球菌属为主,而采用 MALDI-TOF MS 技术快速鉴定尿标本中的微生物时大肠埃希菌鉴定率高达 92.0%,体现了较高的临床应用价值^[10-11]。此外,可通过增加差速离心次数和甲酸乙腈萃取步骤,结合革兰染色涂片镜检及尿常规和有形成分中亚硝酸盐、白细胞酯酶、细菌等其他辅助手段来提高鉴定率,以实现 MALDI-TOF MS 技术快速鉴定尿液中微生物的临床应用。

本研究发现,除 11 例培养出两种菌的标本,以及 1 例副流感嗜血杆菌和 1 例阴道加德纳菌外,其他 7 种菌种类别均显示出规律性:即标本的菌量越多则 MALDI-TOF MS 鉴定率越高。分析原因可能是:菌

量多很大程度上消除了标本制备过程中病原体丢失的影响,且缓冲了杂质干扰,对于 MALDI-TOF MS 未检出且涂片菌量少、杂质多的标本,可重复提纯处理或增加差速离心的标本量,或尝试通过其他检测手段给出鉴定结果。另外 2 例培养结果分别为副流感嗜血杆菌和阴道加德纳菌的标本 MALDI-TOF MS 鉴定结果相应为大肠埃希菌和普通变形杆菌,二者差别很大,本研究在沉渣革兰染色时发现这 2 例标本杂质均较多,分析原因可能是其本身菌体形态的特殊性,均是革兰阴性小杆菌,菌体小,不易与杂质分离,从而导致 MALDI-TOF MS 无法鉴定或误判。

在质谱法中,MS 分值为可信程度分值小于 1.7 表示鉴定结果不可靠,分值大于或等于 1.7 表示鉴定结果可信。本研究发现,大肠埃希菌不仅鉴定率较高,且 MS 分值大于或等于 1.5 的时候鉴定结果已与培养结果一致,体现了较高的鉴定率和准确率,其次是其他肠杆菌科细菌和肠球菌属。非发酵菌科、链球菌属、假丝酵母菌属和其他革兰阳性菌的 MS 分值绝大部分小于 1.7,且部分结果与培养结果存在差异,可信度降低,由此可见,混合感染方面质谱直接检测尿标本存在欠缺,大部分情况下只能鉴定出比例较高的菌种。本研究在沉渣镜检中发现,非发酵菌比如铜绿假单胞菌镜下涂片不均一,细菌大多聚集成团,可能跟其鞭毛结构有关,涂靶板时不易均匀散开,从而影响质谱的鉴定,同样的情况在肠杆菌科中的变形杆菌属也有体现。

综上所述,与传统尿培养比较,采用中段尿差速离心后的沉淀经 MALDI-TOF MS 技术直接鉴定的方法具有简单快速、成本低、准确率高等优点,结合其他辅助方法(如尿常规和有形成分分析等手段),可极大提高 MALDI-TOF MS 技术快速鉴定尿标本微生物的临床应用价值。另外, MALDI-TOF MS 技术也在不断发展和完善,比如扩大标准质谱图库,研究开发耐药性检测模式^[12-14],应用质谱技术直接检测尿标本有不容小觑的应用前景,还需要不断探索和完善。

参考文献

[1] SOGAWA K, WATANABE M, NOMURA F. Rapid identification of microorganisms using MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *Rinsho Byori*, 2013, 61(1): 44-51.

[2] CLARK A E, KALETA E J, ARORA A, 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.

[3] RODRIGUEZ-SANCHEZ B, SANCHEZ-CARRILLO C, RUIZ A, et al. Direct identification of pathogens from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2014, 20(7): 421-427.

[4] HONISCH C, CHEN Y, MORTIMER C, et al. Automated comparative sequence analysis by base-specific cleavage and mass spectrometry for nucleic acid-based microbial typing[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(25): 10649-10654.

[5] 袁梁, 顾海彤, 耿佳靖, 等. 应用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术鉴定临床常见厌氧菌[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(2): 327-329.

[6] VAN BELKUM A, WELKER M, ERHARD M, et al. Biomedical mass spectrometry in Today's and tomorrow's clinical microbiology laboratories[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(5): 1513-1517.

[7] 鲁辛辛, 冯伟明, 顾秀丽. MALDI-TOF MS 技术在临床微生物检验中的应用进展[J]. *中国医学杂志*, 2014, 94(34): 2708-2712.

[8] 谢小芳, 周惠琴, 郑毅, 等. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术直接鉴定血流感染病原菌的效果评价[J]. *中华临床感染病杂志*, 2016, 9(2): 152-155.

[9] CHEN J H, HO P L, KWAN G S, et al. Direct bacterial identification in positive blood cultures by use of two commercial matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(6): 1733-1739.

[10] 候素君, 李建新, 尹盟盟, 等. 尿路感染病原菌监测及耐药性分析[J]. *中国卫生产业*, 2015, 12(11): 3-5.

[11] TIMKO J. Antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae causing urinary tract infections: a central military hospital study[J]. *Chin Med J*, 2014, 127(23): 4150-4151.

[12] 王利军, 范艳艳, 王玫, 等. MALDI-TOF MS 检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的应用价值[J]. *中华医学杂志*, 2013, 93(26): 2079-2081.

[13] WANG L, HAN C H, SUI W J, et al. MALDI-TOF MS applied to indirect carbapenemase detection: a validated procedure to clearly distinguish between carbapenemase-positive and carbapenemase-negative bacterial strains[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(15): 5259-5266.

[14] 李媛睿, 俞静, 刘瑛. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱在革兰阴性杆菌对 β 内酰胺类抗生素耐药性检测中的应用进展[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2016, 16(2): 229-234.