

MALDI-TOF MS 用于 成人泌尿系统感染病原菌鉴定中的应用观察

张冈毅 徐令清* 通讯作者 李绍清 温伟洪 张国明 潘家炜 伍文健
广州医科大学第六附属医院 / 清远市人民医院 广东 清远 511588

【摘要】目的：采用 MALDI-TOF MS 快速准确地检测尿路感染病原菌。**方法：**从 2020 年 1 月到 2021 年 11 月，我院共采集中段尿标本 1953 份。采用不同离心法浓缩细菌，采用 MALDI-TOF MS 快速鉴别病原菌，并与培养结果进行比较。**结果：**在 1953 个中段尿液样本中，MALDI-TOF MS 检出病原菌共 775 株，其中检出革兰阳性球菌、革兰阴性杆菌、念珠菌分别为 663、664、59 株；培养法检出病原菌共 557 株，其中检出革兰阳性球菌、革兰阴性杆菌、念珠菌分别为 528、103、22 株。与培养法相比，MALDI-TOF MS 准确检出革兰阳性球菌、革兰阴性杆菌、念珠菌的符合率分别为 85.55%、83.10%、28.81%。**结论：**MALDI-TOF MS 检测准确率高，可从临床标本直接检测病原体，节省培养时间，为临床诊断提供了快速、有效、准确的手段。

【关键词】 MALDI-TOF MS；成人泌尿系统；病原菌鉴定

【Abstract】Objective MALDI-TOF MS was used to rapidly and accurately detect pathogens of urinary tract infection. **Methods** From January 2020 to November 2021, 1953 midstream urine specimens were collected in our hospital. The bacteria were concentrated by different centrifugation methods, and the pathogenic bacteria were quickly identified by MALDI-TOF MS, and compared with the culture results. **Results** In 1953 midstream urine samples, 775 strains of pathogenic bacteria were detected by MALDI-TOF MS, including 663 strains of Gram-positive cocci, 664 strains of Gram-negative bacilli and 59 strains of Candida. A total of 557 strains of pathogens were detected by culture method, among which 528 strains were Gram-positive cocci, 103 strains were Gram-negative bacilli, and 22 strains were Candida. Compared with the culture method, the coincidence rates of MALDI-TOF MS for accurate detection of Gram-positive cocci, Gram-negative bacilli and Candida were 85.55%, 83.10% and 28.81%, respectively. **Conclusion** MALDI-TOF MS has high detection accuracy, which can directly detect pathogens from clinical specimens, save training time, and provide a rapid, effective and accurate means for clinical diagnosis.

【Key Words】 MALDI-TOF MS; Adult urinary system; Identification of pathogens

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 技术可用于蛋白质、核苷酸和多糖等多种生物分子的分子和结构分析。该方法在分离培养物的细菌分析中提供了较高的稳定性和准确性，明显缩短了传统菌株的分析时间，降低了其成本。近年来，抗生素的广泛使用导致了各种耐药菌的产生。传统的微生物鉴定方法主要包括形态学检测，包括革兰氏染色、生化反应等^[1]。由于对病原物的检测持续时间长、覆盖范围窄，影响了其识别的速度和准确性，并在一定程度上影响了对它的控制。飞行质谱 (MALDI-TOF-MS) 是近年来发展起来的微生物快速检测技术之一。目的通过将微生物的蛋白足迹与已知标准微生物的蛋白足迹数据库^[2] 进行比较，达到鉴定的目的。可以通过将待测细菌的质谱与现有质谱基进行比较来确定细菌种属。由于蛋白质图中分子离子的主要峰值是核糖体蛋白，分布率高，表达稳定性强，结果稳定可靠。

1 材料与方 法

1.1 材料采集

2020 年 1 月至 2021 年 1 月，共收集疑似泌尿系统疾病病例 1953 例，其中男性 976 例，女性 977 例。患者年龄 (59.6±19.1 岁) 为 16 至 104 岁。这项研究得到了医学伦理

委员会的批准，病人或亲属签署了知情同意协议。

1.2 仪器和试剂

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，T100TMPCR 扩增仪、电泳仪、Gel DoxTM XR+ 凝胶成像系统购自美国 BIO-RAD 公司。

试剂：MALDI-TOF-MS 所用试剂包括色谱级乙腈、三氟乙酸、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、Gel Red 核酸染料和 Marker DNA Ladder 购自北京天根生化科技有限公司

1.3 方法

1.3.1 用 10 ul 的接种环将中段尿标本接种于哥伦比亚血琼脂平板中，35° C 培养 18-48 小时，使用 Vitek 2 Compact 全自动微生物分析系统分析结果。

1.3.2 尿液病原体在直接质谱范围内进行评价，并以差速离心法进行浓缩。取 10 毫升尿液样品标本倒入无菌 15 毫升离心管，以 2000r/min 转速离心 5 分钟，去除蛋白。离心完毕，将上清液倒入另外一支无菌 15ml 离心管，以 12000r/min 转

速离心5分钟,弃上清液,在沉淀中加入1ml 0.9%氯化钠注射液,转到1.5ml的EP管中,充分振荡混匀后12000r/min转速离心5分钟,弃上清液,用1ml去离子水洗涤沉淀,12000r/min转速离心5分钟,弃上清液,留沉渣待用。

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。室温自然干燥。再加入1 μL 70%的甲酸,搅拌均匀,室温干燥,为每个样品添加1 μl(干燥后30分钟内必须添加)基质溶液,干燥后将靶板放入MALDI-TOF-MS仪进行质谱分析,图谱采集使用Flex Control软件, Bruker Biotyper软件对检测结果与标准数据库对比,用分值量化判定结果,评分≥2.0分表示鉴定到种的水平;评分为1.7~<2.0表示可鉴定到属的水平;评分<1.7分表示无法鉴定可信结果。

2 结果

2.1 尿细菌培养

从纯中段收集了1953份尿液培养标本,475份尿液中细菌数量≥105 CFU/ML;尿路单菌病775例,两种细菌性疾病183例,三种或三种以上细菌性疾病135例;488个样本含有少于105个CFU/ML,977个样本在普通培养物中不含细菌。

2.2 单菌性泌尿生殖感染的直接定性特征与细菌纯化后培养和质谱研究结果的比较

在1953个中段尿液样本中,MALDI-TOF MS检出病原菌共775株,其中检出革兰阳性球菌、革兰阴性杆菌、念珠菌分别为663、664、59株;培养法检出病原菌共557株,其中检出革兰阳性球菌、革兰阴性杆菌、念珠菌分别为528、103、22株。与培养法相比,MALDI-TOF MS准确检出革兰阳性球菌、革兰阴性杆菌、念珠菌的符合率分别为85.55%、83.10%、28.81%。经过培养和纯化,用MALDI-TOF MS系统对细菌进行了鉴定,与其它结论一致。

2.3 单株尿路感染样品质谱直接鉴定分数的分布

通过对单细菌尿路感染标本的直接检测,富集后在MALDI-TOF MS体内检测到泌尿生殖培养中的阳性细菌,占84.26%(653/775),其中94.80%(528/557)、64.78%(103/159)和37.29%(22/59)。

表1 尿路感染样本直接质谱鉴定分值分布/株

质谱鉴定分值	革兰阴性菌	革兰阳性菌	真菌
0~1.699	29	56	37
1.700~1.999	1	18	10
2.000~2.299	496	73	12
2.300~3.000	20	12	
合计	557	159	59

3 讨论

MALDI-TOF MS技术可用于蛋白质、核苷酸和多糖等多种生物分子的分子和结构分析。其基本原理是:激光束能量吸收后形成马迪离子源的共晶部分,基质与样品之间电荷的转移使样品分子电离;在TOF-MS分析仪部分,在电场作用下,离子加速管的运动,飞行时间与离子的数量成正比,在软件处理中检测病原微生物的指纹,这取决于探头的飞行

时间。所得的光谱图与系统内置数据库中所有可用的参考图进行比较,从而在物种层面识别细菌。MALDI-TOF MS方法在分离培养物的细菌分析中提供了较高的稳定性和准确性,缩短了传统菌株的分析时间,降低了其成本。与最终结果不同的是,9株被鉴定为弗劳吉柠檬酸菌,被鉴定为大肠杆菌菌株,3株被鉴定为肺炎球菌菌株,2株被鉴定为普通蛋白杆菌,1株被鉴定为畸形奇特的杆菌,1株被鉴定为鲍曼杆菌。在被鉴定为溶血性葡萄球菌的10种主要细菌中,直接被鉴定为金黄色葡萄球菌的葡萄球菌最终被鉴定为肠道菌和肠道菌,被鉴定为皮肤上的葡萄球菌物种之一,以及两种乳链球菌。在候选人中,4名平滑候选人和1名白色候选人被归类为酵母。同时,与MARDI-TOF MS稀释相比,皮肤微生物中常见的尿路感染率是104 CFU/ML的两倍,因此MALDI-TOF仪器中细菌的最小浓度应与细菌的种类和数量有一定关系^[5]。

本研究采用高速离心菌对浓缩细菌进行快速直接的TOF-MS分析,并与培养24-48h后形成的单个细菌常规细菌分析结果进行了比较。采用这种快速方法可节省培养过程中的时间,为临床诊断提供了快速、有效、准确的手段,并可根据结果提供适当的抗菌治疗方案,以提高治疗效果。虽然MALDI-TOF MS系统有许多优点,但它也有一定的局限性,如数据库的局限性,其中一些是无法明确区分的;形成影响实验重复的环境差异;设备昂贵,一次性输入成本高;技术门槛高,需要专业培训。也许我们可以通过对样品进行预处理、选择规范数据库、改进数据库、开发实用工具以及与常规实验室方法集成来提高测试的准确性和效率。随着研究的深入和扩大,我们深信这种革命性的科研技术将使我们受益匪浅。

参考文献:

- [1] 李仕诚,李明慧,陈子龙,等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法用于非极性聚合物的分析[J]. 分析化学,2022,50(1):82-91.
- [2] 陈秀英,高保祥,周焕英. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析低分子量化合物的基质的研究进展[J]. 分析化学,2022,50(1):12-24.
- [3] 赵镇文,熊蕾,王振鹏,等. 壳聚糖的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析[J]. 分析化学,2007,35(7):1025-1028.
- [4] 杨梦瑞,王敏,周剑,等. 碲化镉量子点用于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析全氟化合物[J]. 分析化学,2016,44(2):315-318.
- [5] 张珍英,邓慧敏,邓芹英,等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱表征双二氮杂萘酮化合物[J]. 分析化学,2003,31(11):1286-1290.
- [6] 韩欢欢,马岩,王璐,等. 寡糖衍生化及基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析方法研究[J]. 分析化学,2010,38(3):307-312.

作者简介:张冈毅,男,副主任医师,全科医学。

基金项目:清远市科技计划项目(190912164569263)

通讯作者:徐令清