

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪的临床应用体会

曲芬 毛远丽

作者单位:100039 北京市,解放军 302 医院临床检验医学中心

通讯作者:毛远丽, E-mail: maoyuanlee@163.com

【摘要】 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 技术是一项应用于细菌全细胞快速检测的新技术。该技术具有操作简便、检测快速、准确、价格低廉的特点。既弥补了传统细菌鉴定方法检测时间长的缺点,又降低了患者的医疗负担,适用于细菌性感染患者,尤其是危重症患者的快速检测,为临床救治争取了宝贵的时间。MALDI-TOF-MS 技术在临床微生物检验中具有广阔的应用前景。然而,目前该技术的应用仍有一定的局限性,其检测的准确性受被测菌纯度、实验操作等的影响,且对某些菌种的鉴定准确性不高,对病毒检测的过程较复杂等。因此,对 MALDI-TOF-MS 技术的应用局限性以及其在细菌耐药性的常规检测和菌种质谱数据库的扩展等方面仍需进一步的探索研究。

【关键词】 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱;细菌鉴定;病毒检测;药敏试验;革兰阴性杆菌;革兰阳性菌;真菌

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.04.012

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 是近几年快速发展起来的一项应用于细菌全细胞快速检测的技术。其核心技术是利用激光辐射样品与基质的共结晶体,基质分子吸收能量与样品解吸并使其电离,经过飞行时间检测器,将不同质荷比(m/z)的离子分开,形成细菌特异性的质谱图,软件自动将待测细菌质谱图与标准细菌库进行比较,来确定病原菌的种属。临床上细菌性感染由于病情急、重而受到普遍重视,病原学的快速诊断是提高抢救成功率的关键,也是处理突发疫情的必要条件。而细菌生长慢的特性使得其培养时间长、鉴定速度慢,成为快速诊断的瓶颈。德国布鲁克公司的 MALDI Biotyper 型鉴定仪是专门针对微生物快速鉴定而设计,为临床微生物快速诊断带来革命性突破,于 2008 年首次进入临床检验实验室,并在欧美国家得到蓬勃发展。我院自 2011 年应用 MALDI Biotyper 型鉴定仪鉴定临床分离病原菌 23 560 株,并成功获批准军队新技术准入。该鉴定仪具有简便、快速、准确、低耗的特点,也有值得改进及开发的功能,现将其临床应用体会报告如下。

1 MALDI-TOF-MS 技术的特点

1.1 质谱库丰富 MALDI Biotyper 型鉴定仪的 Microflex 质

谱库覆盖范围较广泛,涵盖了临床常见的分离细菌及真菌,同时德国布鲁克公司对质谱库进行不定期更新,客户也可以根据实际情况扩增质谱库。质谱库最初包括 21 个菌属、113 个菌种、4100 余株菌株,现已扩展到 380 个菌属、2250 个菌种、5500 余株菌株,以及超过 100 000 组质谱信号,包括临床少见或生长慢及难培养的分枝杆菌、奴卡菌、军团菌、厌氧菌、原壁菌属、李斯特菌属、奈瑟菌属,也涵盖高致病性细菌如弗朗西斯菌属、炭疽芽孢杆菌、类鼻祖伯克霍尔德菌、霍乱弧菌和布氏杆菌。

1.2 操作简便 MALDI Biotyper 型鉴定仪具有简便、微量、自动化的特点。主要流程只需要单菌落点靶板、加微量基质、靶块快速上机、软件自动判别结果,可实现批量鉴定,不需要革兰氏染色或氧化酶试验等附加试验,根据分值可以确定鉴定的属与种的可信度。仪器维护简便,具备红外激光自动清洗离子源,通过软件自动提醒、一键式启动,15 min 内就可以把离子源清洗干净。

1.3 检测时间短 MALDI-TOF-MS 技术检测速度快,每个样品测定时间仅需 20 s,每 30 min 可测 96 个样品,批量检测速度更快。与传统的鉴定方法比较,普通细菌提早 16-18 h,酵母样真菌提早 24-48 h,丝状真菌 48 h 至 7 d,慢生长细菌如结核分枝杆菌提早 2-6 w^[1]。为细菌性感染的患者特别是

重症患者的救治争取到宝贵的时间,更适合突发疫情的应急处理。

1.4 成本低廉 前期除了仪器的投入,另外仅需要购买基质 α -氰基-4-羟基肉桂酸和基质溶剂乙醇、乙腈和甲酸,这些试剂价廉、基质用量少(1 μ l)、使用时间较长,96 孔不锈钢靶板清洗后可以长期重复利用,大大降低了检验成本。

1.5 鉴定准确 MALDI-TOF-MS 技术应用最广泛、最成熟的是鉴定临床标本分离培养的细菌纯菌落,由于测定的是病原菌的核糖体蛋白,因此具有很高的重复性与准确性。数据库覆盖临床常见的细菌,包括革兰阴性菌、革兰阳性菌以及真菌的不同菌属及种。Benagli 等^[2]用 MALDI-TOF-MS 与 Phoenix、API 和 16S rDNA 序列分析方法对 1019 株菌进行比较研究,证明加德纳菌、尿肠球菌和粪肠球菌等与其他常规方法的鉴定一致率分别为 97.4%、100%、100%,其结果与 16S rDNA 序列分析几乎 100%吻合,但是鹌鸡肠球菌、链球菌属的鉴定一致率较低,分别为 44.4%和 78.9%。我们目前已鉴定临床病原菌 23 560 株,包括细菌的 43 个菌属,132 个菌种,真菌的 8 个菌属,21 个菌种。其中与 VITEK 2 compact 全自动细菌鉴定仪鉴定平行对照 8622 株,直接临床检测 14 838 株,对两种方法不一致的结果以 16S rDNA 序列分析方法确定。结果表明,MALDI-TOF-MS 技术对不同菌属与不同菌种的鉴定能力有差别,主要体现在:(1)主要革兰阴性菌在属和种水平上与 VITEK 2 compact 全自动细菌鉴定仪鉴定结果的符合率分别为大肠埃希菌属(3277 株)99%和 99%、克雷伯菌属(1224 株)97%和 94%、假单胞菌属(743 株)94%和 89%、不动杆菌属(366 株)94%和 76%、肠杆菌属(266 株)93%和 73%、柠檬酸杆菌属(123 株)95%和 84%、沙雷菌属(84 株)93%和 88%、气单胞菌属(72 株)99%和 52%、沙门菌属(58 株)100%和 60%(仅鼠伤寒沙门菌和肠炎沙门菌可鉴定到种)、布鲁菌属(42 株)100%和 100%、弧菌属(36 株)83%和 33%、罗尔斯顿菌属(12 株)100%和 100%;(2)主要革兰阳性菌在属和种水平上与 VITEC II 鉴定结果的符合率分别为葡萄球菌属(434 株)98%和 94%、链球菌属(146 株)77%和 77%、肠球菌属(121 株)98%和 98%;(3)主要真菌在属和种水平上与 VITEC II 鉴定结果的符合率分别为酵母样真菌(227 株)98.68%和 90.31%、丝状真菌(100 株)94%和 52%。鉴定范围除临床常见病原菌外,也成功鉴定了 2 株弯曲菌、4 株放线菌、4 株奴卡菌、8 株厌氧菌和 22 株抗酸杆菌。MALDI Biotyper 型鉴定仪对不同菌种的鉴定能力除了与细菌蛋白特征有关外,也与菌种质谱库是否涵盖该菌属(种),以及操作过程有关。

2 MALDI-TOF-MS 技术的临床应用

2.1 血培养阳性病原菌的鉴定 MALDI Biotyper 型鉴定仪可使用配套的血培养分析试剂盒(MALDI Sepsityper Kit)用于

血培养阳性菌液的直接测定,但成本较高。我们以低成本的无菌体液直接离心及阳性血培养瓶加溶血素等处理亦可得到较好的结果。到目前从阳性腹水及引流液阳性培养瓶中直接提取菌种蛋白,用质谱仪进行鉴定,正确鉴定细菌 162 株,真菌 7 株,从阳性血培养瓶经前处理直接质谱仪鉴定细菌 83 株,均与纯培养后鉴定结果一致,其中包括革兰阴性菌、革兰阳性菌、酵母样真菌及丝状真菌。

对于临床实验室常见的分离株而 MALDI-TOF-MS 鉴定仪尚未涵盖的菌种,我们可以设计并建立质谱库,扩大其应用范围,目前通过自建库方式实现了对宋内志贺菌、马耳他布氏杆菌的准确鉴定。

2.2 耐药性的检测 MALDI-TOF-MS 技术对细菌耐药性的检测潜能也正在逐渐被挖掘。其中研究较多且较成熟的是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)和甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA)^[3,4]。在 Edwards-Jones 等^[5]对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)的耐药研究中发现,MRSA 的质谱图包含多个峰,显著高于 MSSA 的峰,且 MRSA 与 MSSA 都有各自的特征峰。Majcherzyk 等^[4]研究显示,MALDI-TOF-MS 技术能够区分基因型相同而耐药性不同的菌株。特征性图谱是其鉴别菌株的重要前提,另外也可以通过寻找耐药菌株的特征性毒力因子来确定耐药菌,如 Bittar 等^[6]人发现杀白细胞毒素的标记物($m/z=4448$)是 SA 耐药株。Wolters 等^[7]对 MRSA 中的青霉素结合蛋白 PBP2a 检测的研究表明,通过检测 PBP2a 可迅速确认 SA 中的甲氧西林耐药表型。

MALDI-TOF-MS 技术检测产 β -内酰胺酶的耐药菌,其机制主要是通过耐药菌株与抑制 β -内酰胺酶的抗生素共培养,在 β -内酰胺酶存在条件下氨基青霉素脱羧水解,改变了抗生素化合物的分子质量,MALDI-TOF-MS 鉴定仪通过检测分解产物(酶切产物),从而间接证明耐药酶的存在。被测菌株需要与抗生素共同孵育 1-3 h,以产生足以被检测到的酶切产物。这种检测酶切产物的原理也可以应用到其他产酶类细菌的抗性机制研究,如各种耐青霉素类、耐头孢菌素类和耐碳青霉烯类产酶细菌^[8-10]。

3 MALDI-TOF-MS 技术临床应用的局限性

3.1 菌落纯度要求严格 不管是固体培养基的菌落还是液体培养液必须保证被测菌种是纯的,菌落不纯或细菌混合感染均会导致检测失败。

3.2 某些菌种鉴定困难 MALDI-TOF-MS 技术对一些微生物如志贺菌、大肠埃希菌、肺炎链球菌甲型溶血性链球菌(需要做奥普托确证试验)、嗜麦芽窄食单胞菌、假单胞菌、气单胞菌的不同种,无色杆菌属某些种,产碱菌株某些种,李斯特菌不同种的鉴定不尽如人意,可能与细菌之间的亲缘关系相

近或特殊蛋白指纹图谱峰的特征性不明显有关,需要在实际临床应用中不断探索^[11,12]。

3.3 操作过程的影响 选取的菌落纯度、点靶是否均匀、菌膜的厚薄均会影响检测结果的分值,从而影响鉴定的准确性。直接点靶革兰阴性菌较革兰阳性菌更容易鉴定成功。

3.4 质谱数据库的完善 质谱数据库虽然不定期更新,但一些新型、少见菌属或菌种的鉴定仍可能因质谱数据库缺少相应的数据而导致鉴定失败,因此仍需要不断完善和丰富质谱数据库。

3.5 尚未实现细菌药敏试验的常规检测 MALDI-TOF-MS 质谱仪基于细菌耐药机制检测的研究尚处于起步阶段,需结合不同菌种的耐药机制进行研究,或结合其他方法共同完成耐药检测。

3.6 病毒检测的局限性 采用 MALDI-TOF-MS 技术诊断病毒感染还不是很成熟,其检测的结果受 PCR 反应的影响,引物的设计要求比较高,质谱核酸检测对样本的纯度要求很高,PCR 反应体系中的离子会影响质谱检测的分辨率和信号强度,因此对样本需要进行很好的纯化,这使得检测的过程更加复杂^[13,14]。

MALDI-TOF-MS 技术在临床实验室的应用体现了快速、准确、方便、低成本的优越性,适合于常规微生物实验室检测,为细菌性感染患者特别是重症患者的救治争取到宝贵的时间,具有很好的应用前景。但是,无菌体液、血液感染的培养液直接检测标准化方法的探索、细菌耐药性的常规检测、亲缘关系相近病原菌的识别,以及临床菌种质谱库的扩展等问题,使得 MALDI-TOF-MS 技术的应用还需要进一步的开发与探索。

4 参考文献

- 1 鲍春梅,陈素明,崔恩博,等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱快速鉴定革兰阴性杆菌的研究. 实用检验医师杂志, 2012, 4: 96-99.
- 2 Benagli C, Rossi V, Dolina M, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One*, 2011, 6: e16424.
- 3 Bernardo K, Pakulat N, Macht M, et al. Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Proteomics Jun*, 2002, 2: 747-753.

- 4 Majcherzyk PA, McKenna T, Moreillon P, et al. The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Mass Spectrometry*, 2006, 225: 233-239.
- 5 Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, et al. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol*, 2000, 49: 295-300.
- 6 Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, et al. MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Pantone-Valentine leukocidin. *Int J Antimicrob Agents*, 2009, 34: 467-470.
- 7 Wolters M, Rohde H, Maier T, et al. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Int J Med Microbiol*, 2011, 301: 64-68.
- 8 Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol*, 2011, 49: 3321-3324.
- 9 Hrabak J, Walkova R, Studentova V, et al. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 2011, 49: 3222-3227.
- 10 Sparbier K, Schubert S, Weller U, et al. MALDI-TOF MS based functional assay for the rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol*, 2012, 50: 927-937.
- 11 Blondiaux N, Gaillot O, Courcol RJ. MALDI-TOF mass spectrometry to identify clinical bacterial isolates: Evaluation in a teaching hospital in Lille. *Pathol Biol (Paris)*, 2010, 58: 55-57.
- 12 van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*, 2010, 48: 900-907.
- 13 Piao J, Jiang J, Xu B, et al. Simultaneous detection and identification of enteric viruses by PCR-mass assay. *PLoS ONE*, 2012, 7: e42251.
- 14 Kim YJ, Kim SO, Chung HJ, et al. Population genotyping of hepatitis C virus by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of short DNA fragments. *Clin Chem*, 2005, 51: 1123-1131.

(收稿日期: 2015-09-11)

(本文编辑: 李霏)