

# MALDI-TOF MS 在临床微生物检测中的应用

阎萍 王萍 王旭晖

基金项目:新疆昌吉回族自治州科技开发计划项目(2016S08-01)

作者单位:831100 新疆维吾尔自治区昌吉回族自治州,昌吉回族自治州人民医院检验科

通讯作者:阎萍, Email: 1505159331@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2016.04.001

**【摘要】** 目的 探讨应用基质辅助激光解吸电离飞行时间技术质谱(MALDI-TOF MS)在临床微生物快速检测中的应用价值。方法 收集新疆昌吉回族自治州人民医院近两年的分离菌株 525 株,分别分离自痰、尿、血液、分泌物、脓液等临床标本,其中革兰阴性( $G^-$ )细菌 225 株,革兰阳性( $G^+$ )细菌 225 株,酵母菌 75 株。将 MALDI-TOF MS 与 VITEK2 Compact 全自动微生物分析系统(VITEK2 Compact)鉴定结果进行比较。结果  $G^-$  细菌鉴定符合率为 96.4%(217/225),  $G^+$  细菌鉴定符合率为 94.2%(212/225),酵母菌鉴定符合率为 94.7%(71/75)。结论 MALDI-TOF MS 技术快速、简便、准确且价格低廉,在快速鉴定临床常见病原菌方面,尤其是在危重症患者的快速检测方面具有广阔的应用前景,为临床救治争取了宝贵的时间。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<sup>[1]</sup>,因此 MALDI-TOF MS 技术仍需进一步的探索研究。

**【关键词】** 微生物;基质辅助激光解吸电离飞行时间技术质谱;快速检测

## The application of MALDI-TOF MS in the clinical microbiology detection

YAN Ping, WANG Ping, WANG Xu-hui. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Changji Hui Autonomous Prefecture, Changji Hui Autonomous Prefecture 831100, Xinjiang, China

**【Abstract】** **Objective** To explore the application value of the matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometer (MALDI-TOF MS) in rapid detection of clinical microbiology. **Methods** 525 isolation strains were collected in People's Hospital of Changji Hui Autonomous Prefecture in the past two years, that were isolated from sputum, urine, blood, secretions and pus in clinical specimens respectively. Among them, 225 strains of gram negative bacteria, 225 strains of gram positive bacteria, 75 strains of yeast. The MALDI-TOF MS identification results and VITEK2 Compact identification results were compared. **Results** The compliance rate of MALDI-TOF MS and VITEK2 Compact, gram negative bacteria was 96.4% (217/225), gram positive bacteria was 94.2% (212/225), yeast was 94.7% (71/75). **Conclusions** MALDI-TOF MS technology is rapid, simple, accurate and the price is low, it will have broad prospect of application in rapid identification of clinical common pathogenic bacteria especially in rapid detection of critically ill patients, and took precious time for clinical treatment. However, the application of this technology still has some limitations, it's accuracy was affected by the purity of tested bacteria and the ability in experimental operation, and has a low accuracy for some species, the process of detection is more complex for virus<sup>[1]</sup>, therefore MALDI-TOF MS technology still need a further study.

**【Key words】** Microbiology. matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometer. Rapid detection

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS)是近年发展起来的一种新型软电离质谱技术。临床可以采用 MALDI-TOF MS 技术对常见病原菌进行快速鉴定。目前,微生物鉴定主要依靠生化反应鉴定,但鉴定周期长、费用高,且能

力有限,分子生物学鉴定方法虽然准确,但成本昂贵且费时,不适合大量样本的鉴定。MALDI-TOF MS 是一项用来鉴定和分析蛋白的技术, Holland 等<sup>[2]</sup>发现,利用 MALDI-TOF MS 分析细菌全细胞时可检测到高分子质量蛋白质,并根据细菌的图谱鉴定未

知细菌。本研究对 525 株菌株采用 MALDI-TOF MS 与全自动微生物分析系统 (VITEK2 Compact) 进行同步试验,比较 2 种鉴定技术的符合性。

**1 材料与方法**

**1.1 菌株来源** 收集新疆昌吉回族自治州人民医院近两年临床分离菌株 525 株,菌株来源包括痰液、尿液、血液、分泌物、脓液等。

**1.2 质控菌株** 金黄色葡萄球菌 ATCC29213、粪肠球菌 ATCC29212、大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853、大肠埃希菌 ATCC8739、光滑假丝酵母菌 ATCC MYA-2950,质控菌株购自卫生部临床检验中心。

**1.3 仪器与试剂** MALDI-TOF VITEK MS 系统, VITEK2 Compact 自动鉴定仪,以及 GN、GP、NH 和 YST 鉴定卡,均由法国 Biomrieux 公司生产。

**1.4 方法**

**1.4.1 细菌分离培养** 所有菌株标本接种在相应培养基上 (5% 羊血琼脂、巧克力培养基), 35℃ 孵育箱恒温培养 24~48 h (生长条件有特殊要求的菌置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中)。

**1.4.2 细菌的生化鉴定** 采用 VITEK2 Compact 自动鉴定仪及配套鉴定卡,严格按照说明书进行操作。

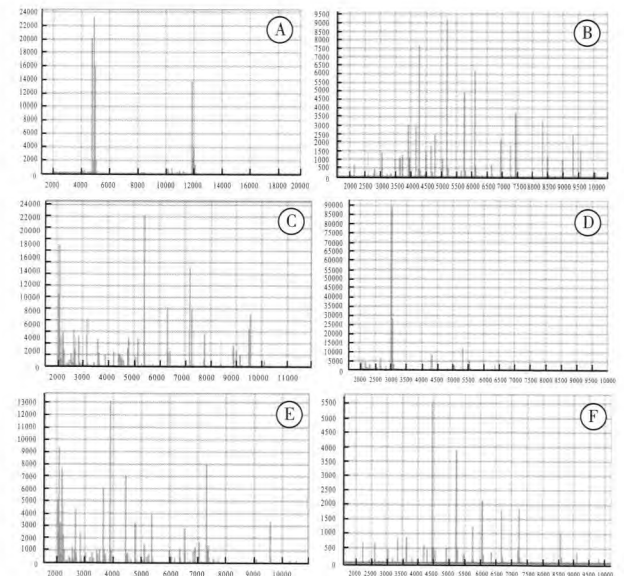
**1.4.3 细菌的 MALDI-TOF MS 鉴定** 质控菌株大肠埃希菌 ATCC8739 涂到校准靶点上,干燥后加 1 μL VITEK MS-CHCA 基质,用无菌接种环取适量纯培养菌落涂在靶板点位中,加 1 μL VITEK MS-CHCA 基质 (酵母菌需先加 0.5 μL VITEK MS-FA 试剂处理,干燥后再加 1 μL VITEK MS-CHCA 基质),待干燥后放入 VITEK MS 仪器中获取细菌全细胞蛋白 (主要是核糖体蛋白) 质谱,然后将待鉴定菌质谱与数据库中已知菌质谱进行比较,分析从而获得结果。VITEK MS 系统可得到从 0% 到 99.9% 的匹配百分率,匹配百分率 ≥ 70% 时结果可信度高,匹配百分率 < 70% 认为其无法提供鉴定结果。

**2 结果**

**2.1 MALDI-TOF MS 与 VITEK2 Compact 鉴定结果** 革兰阳性 (G<sup>+</sup>) 细菌鉴定符合率为 94.2% (212/225); 革兰阴性 (G<sup>-</sup>) 细菌鉴定符合率为 96.4% (217/225); 酵母菌鉴定符合率为 94.7% (71/75)。见图 1。

**2.2 MALDI-TOF MS 与 VITEK2 Compact G<sup>+</sup> 细菌鉴定结果** 在 225 株 G<sup>+</sup> 细菌中 212 株匹配百分率 ≥ 70%, 鉴定符合率为 94.2% (212/225); 13 株匹配百分率 < 70%, 包括 1 株溶血葡萄球菌、2 株无乳链球

菌、3 株咽峡炎链球菌、3 株口腔链球菌、2 株鹌鸡肠球菌。见表 1。



注: A 为白假丝酵母菌, B 为鲍曼不动杆菌, C 为肺炎克雷伯菌, D 为金黄色葡萄球菌, E 为屎肠球菌, F 为铜绿假单胞菌

图 1 临床微生物常见病原菌的质谱图

表 1 MALDI-TOF MS 与 VITEK2 Compact G<sup>+</sup> 细菌鉴定结果比较

细菌名称	VITEK2 Compact (株)	MALDI-TOF MS (株)	鉴定符合率 (%)
金黄色葡萄球菌	25	25	100.0
表皮葡萄球菌	25	25	100.0
溶血葡萄球菌	25	24	96.0
无乳链球菌	25	23	92.0
咽峡炎链球菌	25	22	88.0
口腔链球菌	25	22	88.0
粪肠球菌	25	25	100.0
屎肠球菌	25	25	100.0
鹌鸡肠球菌	25	23	92.0
合计	225	212	94.2

**2.3 MALDI-TOF MS 与 VITEK2 Compact G<sup>-</sup> 细菌鉴定结果** 在 225 株 G<sup>-</sup> 细菌中 217 株匹配百分率 ≥ 70%, 鉴定符合率为 96.4% (217/225); 8 株匹配百分率 < 70%, 包括 3 株肺炎克雷伯菌、2 株阴沟肠杆菌、2 株摩根摩根菌、1 株洋葱伯克霍尔德菌。见表 2。

**2.4 MALDI-TOF MS 与 VITEK2 Compact 酵母样真菌鉴定结果** 在 75 株酵母样真菌中 71 株匹配百分率 ≥ 70%, 鉴定符合率为 94.7% (71/75), 4 株匹配百分率 < 70%, 包括 2 株克柔假丝酵母菌、2 株近平滑假丝酵母菌。见表 3。

表 2 MALDI-TOF MS 与 VITEK2 Compact G<sup>-</sup>细菌鉴定结果比较

细菌名称	VITEK2 Compact (株)	MALDI-TOF MS (株)	鉴定符合率 (%)
大肠埃希菌	25	25	100.0
肺炎克雷伯菌	25	22	88.0
阴沟肠杆菌	25	23	92.0
摩根摩根菌	25	23	92.0
流感嗜血杆菌	25	25	100.0
铜绿假单胞菌	25	25	100.0
鲍曼不动杆菌	25	25	100.0
嗜麦芽窄食单胞菌	25	25	100.0
洋葱伯克霍尔德菌	25	24	96.0
合计	225	217	96.4

表 3 MALDI-TOF MS 与 VITEK2 Compact 酵母样真菌鉴定结果比较

细菌名称	VITEK2 Compact (株)	MALDI-TOF MS (株)	鉴定符合率 (%)
白假丝酵母菌	25	25	100.0
克柔假丝酵母菌	25	23	92.0
近平滑假丝酵母菌	25	23	92.0
合计	75	71	94.7

### 3 讨论

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,一种新型软电离质谱技术。MALDI 的原理是利用激光照射标本与基质形成共结晶膜,基质从激光中吸收能量传递给标本中的生物分子,并将质子转移到生物分子而使生物分子发生电离。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,待测离子的质荷比(M/Z)与离子的飞行时间成正比。最终结果是获得指纹图谱,通过对代表某种菌株特定表型的生物标志物进行分离分析,通过建立新的蛋白质谱指纹图谱数据库,或利用已有蛋白质谱指纹图谱数据库中的信息,比较待测菌株与标准参考菌株的质谱图而对微生物的种属进行鉴定<sup>[3-6]</sup>。

MALDI-TOF MS 对葡萄球菌、肠球菌及部分肠杆菌鉴定符合率可达 95% 以上,但 MALDI-TOF MS 与 VITEK2 Compact 在  $\alpha$  溶血链球菌的鉴定符合率较低。另外,由于鹌鸡肠球菌和铅黄肠球菌的同源性较高,因此二者不易区分。在肠道致病菌中, MALDI-TOF MS 分析法不能区分大肠埃希菌和志贺菌,鉴定结果显示为大肠埃希菌时也可能是

志贺菌,应考虑患者的临床情况和病史,并通过血清学试验确定鉴定结果,有研究认为这是志贺菌属与大肠埃希菌的基因组相似造成的。因此,为提高 MALDI-TOF MS 对细菌的鉴定能力,仪器生产商有必要对图谱数据库逐步完善。由于菌株来源多样、地域来源有差异,每一菌种特定谱图的采集应参考多个同种菌株。

Conway 等<sup>[7]</sup>研究了培养基种类和培养时间对大肠埃希菌的影响,结果表明培养基种类和培养时间影响生物标记分子的出现,甚至不同培养基引起质谱图的变化相当于不同菌株间的区别。本研究选用哥伦比亚血琼脂和巧克力平板。

MALDI-TOF MS 用于临床微生物的鉴定具有快速、准确、方便、低成本的优越性,较传统的鉴定方法快 16~18 h,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<sup>[8]</sup>,然而某些菌种尚未收录在质谱数据库中导致我们在检测过程中受到限制,因此我们只有不断的探索研究完善数据库才能更好地应用这项新技术。

### 4 参考文献

- 1 曲芬,毛远丽. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪的临床应用体会. 实用检验医师杂志, 2015, 7: 243-245.
- 2 Holland RD, Wilkes JC, Rafil F, et al. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom, 1996, 10: 1227-1232.
- 3 Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. J Clin Microbiol, 2010, 48: 1169-1175.
- 4 Wunschel SC, Jarman KH, Petersen CE, et al. Bacterial analysis by MALDI-TOF mass spectrometry: an inter-laboratory comparison. J Am Soc Mass Spectrom, 2005, 16: 456-462.
- 5 Fetsch PA, Simone NL, Bryant-Greenwood PK, et al. Proteomic evaluation of archival cytologic material using SELDI affinity mass spectrometry: potential for diagnostic applications. Am J Clin Pathol, 2002, 118: 870-876.
- 6 Camara JE, Hays FA. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant Escherichia coli by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. AnalBioanal Chem, 2007, 389: 1633-1638.
- 7 Conway GC, Smole SC, Sarracino DA, et al. Phyloproteomics: species identification of Enterobacteriaceae using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. J Mol Microbiol Biotechnol, 2001, 3: 103-112.
- 8 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.

(收稿日期: 2016-11-07)

(本文编辑: 李银平)