

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 在流感嗜血杆菌鉴定中的应用

张雪英 叶慧

作者单位: 211112 江苏南京, 南京艾迪康医学检验所有限公司

通信作者: 张雪英, Email: xueying.zhang@adicon.com.cn

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2024.03.020

【摘要】 目的 分析基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOP MS) 在流感嗜血杆菌鉴定中的应用。**方法** 收集 2022 年 1—12 月南京艾迪康医学检验所有限公司实验室接收的 1 300 份呼吸道感染患者的痰液或咽拭子样本培养和分离的嗜血杆菌, 经 16SrDNA 序列测定检出 50 株为流感嗜血杆菌; 分别使用 MALDI-TOP MS 检测系统、Analytic Products INC (API) 生化细菌鉴定系统以及纸片法卫星试验对流感嗜血杆菌进行鉴定, 比较并分析 3 种方法对流感嗜血杆菌的检出率、检测时间、检测成本及读取方式。**结果** MALDI-TOP MS 检测系统对流感嗜血杆菌的检出率为 98.0%, API 生化细菌鉴定系统的检出率为 90.0%, 纸片法卫星试验的检出率为 74.0%。MALDI-TOP MS 对流感嗜血杆菌的检出率明显高于纸片法卫星试验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而与 API 生化细菌鉴定系统比较检出率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。MALDI-TOP MS 检测所用时间为 5~10 min, API 生化细菌鉴定检测所用时间为 4~24 h, 纸片法卫星试验检测所用时间为 24~48 h。采用 MALDI-TOP MS 鉴定流感嗜血杆菌的成本更低, 传统 API 生化细菌鉴定方法价格昂贵, 而纸片法卫星试验操作比较繁琐。**结论** MALDI-TOP MS 检测系统对流感嗜血杆菌鉴定的准确率较高, 鉴定周期较短, 成本较低, 且使用方便, 在临床上对流感嗜血杆菌的检出具有重要价值。

【关键词】 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 流感嗜血杆菌; Analytic Products INC 生化细菌鉴定系统; 纸片法卫星试验

Application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in identification of *Haemophilus influenzae*

Zhang Xueying, Ye Hui. Nanjing Adikang Medical Laboratory Co., Ltd., Nanjing 211112, Jiangsu, China

Corresponding author: Zhang Xueying, Email: xueying.zhang@adicon.com.cn

【Abstract】 Objective To analyze the application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOP MS) in the identification of *Haemophilus influenzae*. **Methods** The 1 300 samples of sputum or throat swab received in the laboratory of Nanjing Aidikang Medical Laboratory Co., Ltd. from January to December, 2022 were collected from respiratory infection patients, from which *Haemophilus influenzae* was cultivated and isolated. Using 16SrDNA sequencing, 50 strains of *Haemophilus influenzae* were detected. The MALDI-TOP MS detection system, Analytical Products INC (API) biochemical bacterial identification system and paper method satellite experiment were used to identify *Haemophilus influenzae* and the detectable rate, detection time, detection cost and reading method of above three methods were compared. **Results** The detectable rate of *Haemophilus influenzae* by MALDI-TOP MS was 98.0%, the detectable rate of API biochemical bacterial identification system was 90.0%, and the detectable rate of paper disk satellite test was 74.0%. The detectable rate of *Haemophilus influenzae* by MALDI-TOP MS was higher than that of paper disk method satellite test, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). However, compared with API biochemical bacterial identification system, the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The time required for MALDI-TOP MS detection was 5–10 minutes, the time required for API biochemical bacterial identification detection was 4–24 hours, and the time required for paper disk satellite test detection was 24–48 hours. The cost of using MALDI-TOP MS to identify *Haemophilus influenzae* was lower, traditional API biochemical identification method was expensive, and the paper disk method satellite test operation was cumbersome. **Conclusions** The MALDI-TOP MS detection system has high accuracy, short identification cycle and low cost in identifying *Haemophilus influenzae*, and is easy to use. It has important value in the clinical detection of *Haemophilus influenzae*.

【Key words】 Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; *Haemophilus influenzae*; Analytic Products INC biochemical bacterial identification system; Paper method satellite experiment

流感嗜血杆菌常定植于正常人体呼吸道(全部人群中约有 50% 在呼吸道定植),当机体抵抗力下降时可引起呼吸道感染,常继发流感、麻疹、百日咳、肺结核等呼吸道感染疾病^[1]。流感嗜血杆菌是引起儿童社区获得性肺炎的主要致病菌,其检出率在革兰阴性(Gram negative, G⁻)菌中位居第三^[2-3]。该菌也可随血液入侵组织内部,引起脑膜炎、关节脓肿或其他部位的化脓性感染。同时,感染流感嗜血杆菌会引发中耳炎,严重影响患者身体健康,甚至威胁生命^[4]。副流感嗜血杆菌是定植于人类呼吸道的正常菌群,也可引起心内膜炎、肾炎、泌尿生殖道感染、胆道感染、腹膜炎等多种疾病,但对其是否为下呼吸道感染的致病菌目前还存在争议^[1]。因此,流感嗜血杆菌的准确诊断对临床治疗呼吸道感染具有重要价值。然而长期以来,受鉴定手段的限制,流感嗜血杆菌的鉴别主要依赖于细菌培养和传统生化反应检测方法,导致该菌的检出周期长,检出率低,甚至出现鉴定错误。随着鉴定水平的提高,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOP MS)通过对菌种蛋白质组学的快速检测,可对流感嗜血杆菌进行高效和准确的判断,在快速鉴定病原菌方面得到广泛应用^[5-7]。为进一步评价 MALDI-TOP MS 在流感嗜血杆菌鉴定中的应用价值,本实验室对此进行了研究,现报告如下。

1 资料和方法

1.1 样本收集 收集 2022 年 1—12 月本实验室接收的 1 300 例呼吸道感染患者的痰液或咽拭子样本,其中男性 630 例,女性 670 例;年龄 5~86 岁,平均(45.25±5.28)岁。

1.1.1 纳入标准 ① 呼吸道感染患者;② 患者临床资料完整;③ 样本采集均为无菌操作;④ 在使用抗菌药物前采集样本;⑤ 符合合格痰样本标准:白细胞 > 25/LP,上皮细胞 < 10/LP。

1.1.2 排除标准 ① 合并中枢神经系统感染或合并脓毒症的患者;② 恶性肿瘤患者;③ 短期内接受过糖皮质激素或免疫抑制剂治疗的患者。

1.1.3 伦理学 本研究符合医学伦理学标准,并经本单位伦理审批(审批号:20240417)。所有检测均获得过受检者或家属知情同意。

1.2 仪器与试剂 Analytic Products INC(API)生化细菌鉴定系统购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司,聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)

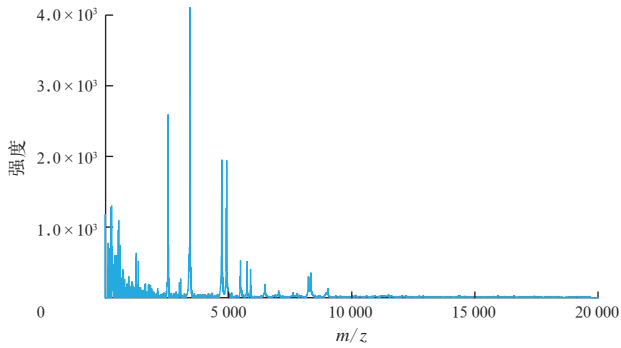
扩增试剂为日本 TOYOBO 公司产品;EXS 3000 全自动微生物质谱仪及配套软件购于重庆中元公司,质谱系统样本处理基质溶液(乙腈:纯水:三氟乙酸,体积比为 20:19:1);API 生化细菌鉴定板条以及奈瑟菌、嗜血杆菌鉴定卡均由法国梅里埃公司提供;BSC-1500 II A2-X 生物安全柜购于山东博科公司;嗜血巧克力平板和血琼脂平板均购自郑州安图公司、凝血因子(V、X、V+X)纸片均购自英国 OXOID 公司。

1.3 检测方法 按照《全国临床检验操作规程》(第四版)^[8]将待测样本接种于嗜血巧克力平板上,培养条件为 35℃ 5% CO₂ 环境培养 18~24 h。待嗜血巧克力平板上生长出较小、无色透明、似露珠状的菌落(部分菌株可产生黏液状菌落),革兰染色为阴性短小杆菌时,分别进行 MALDI-TOP MS、API 生化细菌鉴定及纸片法卫星试验。

1.3.1 16SrDNA 序列测定 采用 DNA 提取试剂提取所需模版,使用引物对 16SrRNA 基因进行扩增,检测结果为阳性时再进行 DNA 序列测序。所得序列在基本局部对齐搜索工具数据库(Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)中进行比对后,即可对结果做出判读,最高分值菌种有可能就是样本菌株对应的菌种,同时结合患者的临床表现和镜下菌落形态,发出最终报告。

1.3.2 MALDI-TOP MS 鉴定系统 挑取嗜血巧克力平板上的单个菌落,均匀涂抹在靶板的样品孔内,并在质控点添加大肠埃希菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、白色念珠菌 ATCC90028,在室温下待其自然晾干,再用无菌移液器滴加 1 μL 基质溶液覆盖样品,自然晾干后进行采集。报告数据的说明:采集质谱图后,软件将获得的质谱图与标准谱库进行匹配检索,完成对样品的微生物鉴定,并以颜色评估每个样品位点鉴定结果的置信水平。当打分值 ≥ 2.0 时,鉴定结果显示为绿色,代表可能的种水平鉴定,分值越高,种水平的置信度越高;当 1.7 ≤ 打分值 < 2.0 时,鉴定结果显示为黄色,代表可能的属水平鉴定,分值越高,属水平的置信度越高;当打分值 < 1.7 时,鉴定结果显示为红色,表示鉴定结果置信度较低,即为不可靠鉴定。见图 1。

1.3.3 API 生化细菌鉴定系统 采用 API 生化细菌鉴定板条检测嗜血杆菌的吡啶产生以及脲酶、鸟氨酸和赖氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶和糖苷酶的活性等,通过比色方法进行鉴定。



注：MALDI-TOP MS 为基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱， m/z 为质荷比

图 1 流感嗜血杆菌 MALDI-TOP MS 鉴定谱图

1.3.4 纸片法卫星试验 取 0.5 麦氏单位比浊浓度的被检菌液涂抹于血琼脂平板上，贴 V、X、V+X 因子纸片（纸片间距 > 5 cm），在 35 °C 5.0% CO₂ 环境中孵育 24 h，如果观察到被检菌株在纸片周围生长，远离纸片不生长的现象，即为卫星试验阳性^[9]。

1.4 观察指标 ① 以 16SrDNA 序列测定结果作为“金标准”，比较 MALDI-TOP MS、API 生化细菌鉴定系统和纸片法卫星试验 3 种方法的不同特点以及对流感嗜血杆菌的检出率；② 比较 MALDI-TOP MS、API 生化细菌鉴定系统和纸片法卫星试验 3 种方法鉴定流感嗜血杆菌所用的时间差异。

1.5 统计学方法 使用 Excel 和 SPSS 21.0 统计学软件完成本研究结果的记录和数据处理。符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示，两组间比较采用 *t* 检验；计数资料的分析以百分比 (%) 形式表示，组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同鉴定方法对流感嗜血杆菌的检出率比较 16SrDNA 序列测定检出的 50 株流感嗜血杆菌中有 37 株由 3 种方法均可检出，49 株由 MALDI-TOP MS 检出，45 株由 API 生化细菌鉴定系统检出；MALDI-TOP MS、API 生化细菌鉴定系统和纸片法卫星试验的检出率分别为 98.0%、90.0%、74.0%。MALDI-TOP MS 的检出率明显高于纸片法卫星试验，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，但与 API 生化细菌鉴定系统比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 不同鉴定方法对流感嗜血杆菌的检测特点比较 MALDI-TOP MS 鉴定的用时最短，成本最低，且能够直接读取细菌名称。在鉴定周期、检测成本和操作便捷度等方面均优于 API 生化细菌鉴定系统和纸片法卫星试验。见表 2。

表 1 不同鉴定方法对流感嗜血杆菌的检出率比较

方法	样本数 (份)	阳性数 (份)	检出率 (%)
MALDI-TOP MS	50	49	98.0
API 生化细菌鉴定系统	50	45	90.0
纸片法卫星试验	50	37	74.0 ^a

注：MALDI-TOP MS 为基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱；与 MALDI-TOP MS 比较，^a $P < 0.05$

表 2 不同鉴定方法对流感嗜血杆菌的鉴定特点比较

方法	所用时间	成本	结果读取方式
MALDI-TOP MS	5 ~ 10 min	低	系统显示
API 生化细菌鉴定系统	4 ~ 24 h	高	系统显示
纸片法卫星试验	24 ~ 48 h	中等	人工判读

注：MALDI-TOP MS 为基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

3 讨论

嗜血杆菌属细菌寄生在人和动物的黏膜组织中，在人体内主要寄生在咽喉及口腔黏膜，少见於消化道和生殖道。引起人类疾病的主要嗜血杆菌种类为流感嗜血杆菌，易引起儿童中耳炎和社区获得性肺炎，导致老年患者慢性阻塞性肺疾病（慢阻肺）恶化等^[10]。小儿急性下呼吸道感染是儿科常见的疾病之一^[11-12]，因此呼吸道菌群的精准鉴定至关重要。在呼吸道定植的正常菌群种类繁多，因此需将流感嗜血杆菌与副流感嗜血杆菌及其他嗜血杆菌进行鉴别，然而，由于抗菌药物滥用导致细菌变异^[13]，以及检验人员操作及主观判断能力等多方面的影响，给流感嗜血杆菌的鉴定带来困难。传统的生化鉴定方法受传代、细菌变异等影响，易出现生化反应不明显或生化反应不良^[14]，而纸片鉴定方法主要依靠检验人员的主观判断，因此降低了细菌检出率。上述鉴定方法已无法满足临床检验的需求，寻找更准确、快速的鉴定手段近年来已成为研究热点。

MALDI-TOP MS 的出现为微生物鉴定带来巨大的变革，加速了微生物鉴定技术的发展过程^[15-16]。MALDI-TOP MS 检测的原理为样品靶上的基质和样品在激光能量的触发下由分子转变为离子，同时样品靶上加有高压，在离子源中形成高压电场，样品离子与基质在电场作用下加速飞行，当离子飞出离子源后，在飞行管中匀速飞行，直至到达检测器，不同质荷比 (m/z) 的离子到达检测器的时间不同，离子最终在检测器上产生电子信号，再经过数字转换器处理，可在计算机上获得数字信号，最终经过计算机处理分析能够获得相应样品的质谱图，将样品的质谱图与微生物蛋白指纹图谱进行检索，实现对样品的鉴定^[17-18]。

本研究通过比较 MALDI-TOP MS、API 生化细菌鉴定系统和纸片法卫星试验 3 种方法对流感嗜血杆菌的检出率、时效性、成本及操作便捷性等方面得出结论。MALDI-TOP MS 对流感嗜血杆菌的检出率(98.0%)较高,优于 API 生化细菌鉴定系统(90.0%),但差异无统计学意义;MALDI-TOP MS 与纸片法卫星试验比较,鉴定符合率(98.0%)明显高于纸片法卫星试验(74.0%),差异有统计学意义。因此采用 MALDI-TOP MS 对流感嗜血杆菌的鉴定更具应用价值。在检测时效方面,采用 MALDI-TOP MS 鉴定流感嗜血杆菌只需 5~10 min,其次为 API 生化细菌鉴定系统,需要 4~24 h,纸片法卫星试验检测周期最长,需要 24~48 h。表明 MALDI-TOP MS 对流感嗜血杆菌的鉴定时效性明显优于 API 生化细菌鉴定系统和纸片法卫星试验。

另外, MALDI-TOP MS 通过检测获得的肽指纹图谱与预存数据库进行匹配检索,即可直接显示细菌名称,无需人为判读,且成本较低,操作简便;而 API 生化细菌鉴定系统检测成本较高,生化反应不良时需延长反应时间或进行重复试验;纸片法卫星试验操作繁琐,结果需要人为判断,受人员能力限制,易造成主观判断错误,且对流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌以外的嗜血杆菌无法进行区分。

综上所述,与 API 生化细菌鉴定系统和纸片法卫星试验比较, MALDI-TOP MS 对流感嗜血杆菌的鉴定更具准确性和科学性,在临床诊断流感嗜血杆菌方面具有重要价值,值得推广应用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- 周庭银,章强强. 临床微生物学诊断与图解[M]. 4版. 上海:上海科学技术出版社,2017.
- 闫小燕,朱金玉,李燕,等. 儿童肺炎流感嗜血杆菌的分布及耐药性分析[J]. 医药论坛杂志,2023,44(19):110-112. 封3.
- 蒋娟,石远滨. 儿童社区获得性肺炎细菌病原分布及细菌耐药情况分析[J/CD]. 世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊),2020,20(43):1-2,5. DOI: 10.3969/j.issn.1671-3141.2020.43.001.
- 王雪宁,朱巧棉. 侵袭性流感嗜血杆菌感染患儿的临床特征及预后分析[J]. 临床医学研究与实践,2023,8(19):44-47. DOI: 10.19347/j.cnki.2096-1413.202319011.

- 刘娜,赵琳娜,张伟,等. 16S rRNA 基因序列、生化鉴定、质谱 3 类方法鉴定常见微生物的结果分析[J]. 食品安全质量检测学报,2019,10(1):60-64. DOI: 10.3969/j.issn.2095-0381.2019.01.010.
- DIECKMANN R, MALORNY B. Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(12): 4136-4146. DOI: 10.1128/AEM.02418-10.
- HUANG C H, HUANG L. Rapid species- and subspecies-specific level classification and identification of *Lactobacillus casei* group members using MALDI Biotyper combined with ClinProTools [J]. J Dairy Sci, 2018, 101(2): 979-991. DOI: 10.3168/jds.2017-13642.
- 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社:2015.
- 陈东科,孙长贵. 实用临床微生物学检验与图谱[M]. 北京:人民卫生出版社:2011.
- 陈虹宇,刘梓豪,王和平,等. 不可分型流感嗜血杆菌生物膜在儿童慢性肺部感染中的作用[J]. 临床儿科杂志,2023,41(8):589-593. DOI: 10.12372/jcp.2023.22e0427.
- 李娟,杨军,肖岳. 评价经皮给药治疗仪佐治小儿急性下呼吸道感染临床疗效[J]. 中国中西医结合急救杂志,2000,7(6):372. DOI: 10.3321/j.issn:1008-9691.2000.06.019.
- 胡琼,莫丽亚,李先斌,等. 儿童呼吸道感染流感嗜血杆菌的耐药性分析及复合感染特点[J]. 实用检验医师杂志,2019,11(4):196-199. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2019.04.002.
- 张静,王姣贤,董蓉,等. 流感嗜血杆菌多位点序列分型及同源性分析[J]. 传染病信息,2023,36(3):248-251,255. DOI: 10.3969/j.issn.1007-8134.2023.03.011.
- 周淑燕,柳丽娟,卓传尚,等. 梅里埃 MALDI-TOF-MS 系统与 VITEK2 Compact 全自动微生物鉴定仪对临床常见病原菌鉴定的一致性分析[J]. 现代检验医学杂志,2020,35(2):92-96. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.02.026.
- 刘聪聪,李佳萍,周宏伟. 2 套质谱系统临床微生物鉴定性能评估[J]. 检验医学,2022,37(11):1084-1088. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2022.011.017.
- 赵世铭. 质谱技术应用于临床微生物检测中的研究进展[J]. 中国医疗器械信息,2020,26(17):28-29,106. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6586.2020.17.012.
- 尹盼盼,白雯静,李海燕,等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在微生物鉴定中的研究进展[J]. 微生物学通报,2023,50(10):4655-4666. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.230127.
- 闫雯倩,陈企发,夏炎. 基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)在微生物鉴定中的应用[J]. 化学教育,2022,43(10):7-14. DOI: 10.13884/j.1003-3807hxjy.2021040081.

(收稿日期:2024-04-12)

(本文编辑:邵文)