

MALDI-TOF MS 和 Phoenix™-100 两种分析仪鉴定肠杆菌科细菌一致性评价

屈晨虹^a, 丁雨^b, 史伟峰^b

(苏州大学附属第三医院 a. 输血科; b. 检验科, 江苏常州 213003)

摘要: 目的 评价德国 Bruker 公司的基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 和美国 BD 公司的菲尼克斯 100(Phoenix™-100) 细菌鉴定仪对临床分离肠杆菌科细菌鉴定的一致性。方法 回顾性分析 2017 年 1 月~2019 年 8 月苏州大学附属第三医院从临床各类标本中分离出的肠杆菌科细菌 1 242 株, MALDI-TOF MS 和 Phoenix™-100 细菌鉴定仪对这些菌株进行鉴定, 运用统计学方法分析并评估两种仪器的鉴定结果的一致性。结果 在两台仪器均能鉴定到属水平的 1 242 株细菌中, 鉴定到菌种水平的一致率达 85.1% (1 057 株)。在 8 株肺炎克雷伯菌的鉴定上, Phoenix™-100 鉴定出 6 株, MALDI-TOF MS 鉴定出 2 株, 两组间的鉴定比较差异有统计学意义 ($\chi^2=4.00$, $P=0.046$), 在其他种水平上的鉴定结果差异无统计学意义 ($\chi^2=0.207\sim 4.000$, 均 $P > 0.05$)。沙门菌属均未能鉴定到种水平。结论 两种仪器都能准确鉴定肠杆菌科细菌到属水平, 可用于临床微生物实验室对临床标本的常规鉴定, 但对肺炎克雷伯菌和沙门菌属并不能精准的鉴定到种水平。

关键词: 耐碳青霉烯类肠杆菌; 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱; 细菌鉴定

中图分类号: R446 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 02-097-04

doi:10.3969 / j.issn.1671-7414.2020.02.027

Consistency of MALDI-TOF MS and Phoenix™-100 to Identify Enterobacteriaceae Bacteria

QU Chen-hong^a, DING Yu^b, SHI Wei-feng^b

(a. Department of Blood Transfusion; b. Department of Clinical Laboratory,

the Third Affiliated Hospital of Soochow University, Jiangsu Changzhou 213003, China)

Abstract: Objective To evaluate the consistency of MALDI-TOF MS and Phoenix™-100 identification instruments for the identification of bacteria in clinical Enterobacteriaceae. **Methods** From January 2017 to August 2019, 1 242 strains of common Enterobacteriaceae bacteria isolated from various clinical specimens in the Third Affiliated Hospital of Soochow University were retrospectively analyzed. These strains were identified with MALDI-TOF MS and Phoenix™-100 identification instruments, and the consistency of the identification results of the two instruments was analyzed and evaluated using statistical methods. **Results** In the 1 242 strains of bacteria that could be identified at genus level by both instruments, the consistent rate of identification at species level was 85.1%. On the identification of 8 strains of *Klebsiella ozaenae*, 6 strains were identified by Phoenix™-100 and 2 strains by MALDI-TOF MS, with statistically significant differences ($\chi^2=4.00$, $P=0.046$), and the difference of identification results at other levels was not statistically significant ($\chi^2=0.207\sim 4.000$, all $P > 0.05$). *Salmonella* species were not identified. **Conclusion** Both instruments could accurately identify Enterobacteriaceae bacteria to genus level, which can be used for routine identification of clinical specimens in the clinical microbiology laboratory, but they cannot accurately identify the *Klebsiella ozaenae* and the genus of *salmonella*.

Keywords: carbapenem-resistant enterobacteriaceae (CRE); MALDI-TOF MS; Phoenix™-100; bacterial identification

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 对微生物检测有高效准确的特点, 是近年迅速发展出来的新型质谱技术^[1-2]。通过基质辅助激光解析电离微生物蛋白, 检测飞行时间换算出核糖体蛋白质/带电荷量, 对比微生物特征性蛋白数据库进行鉴定。美国 BD 公司的菲尼

克斯 100 (Phoenix™-100) 已广泛应用于临床微生物的鉴定^[3-4], 通过周期性监测微生物参与的显色反应和荧光生化反应对细菌进行鉴定, 给出置信率 90% 以上的鉴定结果。

肠杆菌科细菌是临床感染性疾病中最常见的致病菌, 碳青霉烯类药物被认为是治疗产超广谱 β -

作者简介: 屈晨虹 (1990-), 女, 本科, 检验师, 从事临床微生物学和免疫学研究, E-mail: quchenhongnew@163.com。

通讯作者: 史伟峰, 男, 副教授, 硕士生导师, 主要从事临床微生物学研究, E-mail: swf67113@163.com。

内酰胺酶 (extended-spectrum β -lactamases, ESBLs) 和头孢菌素酶 (AmpC) 肠杆菌感染的重要方法。近年来随着临床上抗生素的滥用, 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌 (Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae CRE) 所致医院感染已经爆发数次并在全球流行, 对该类菌引起的感染尽早诊断和准确治疗已成为临床亟待解决的重要问题^[1]。传统的形态学、细胞生理学、生化反应鉴定法均难以区分相似的菌种, 快速精准的细菌鉴定结果能及时指导临床合理使用抗生素, 大大延缓耐药性的产生和蔓延^[6]。本次研究目的是评价 MALDI-TOF-MS 和 PhoenixTM-100 在鉴定临床送检标本中分离出的肠杆菌科细菌一致性, 为临床提供准确鉴定结果, 指导合理用药, 有效控制耐药菌的发展。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 2017年1月~2019年8月, 在苏州大学附属第三医院送检的临床标本中, 分离出的肠杆菌科细菌 1 242 株, 其中肠杆菌属 82 株, 变形杆菌属 22 株, 克雷伯菌属 318 株, 埃希菌属 784 株, 沙雷菌属 29 株, 沙门菌属 7 株。标本来源: 痰液标本 491 株, 血液标本 286 株, 尿液标本 160 株, 无菌体液标本 305 株。埃希菌属主要来源于肾内科、泌尿科和胃肠外科。克雷伯菌属主要来源于神经外科和重症医学科。其他菌属的菌株无规律的分布在免疫风湿科、内分泌科、肝胆外科等科室。

1.2 仪器和试剂 CO₂ 培养箱购自美国 Thermo 公司; 二级生物安全柜购自苏州安泰公司; PhoenixTM-100 细菌鉴定仪及配套试剂和鉴定板、PhoenixSpec 比浊仪购自美国 BD 公司; MALDI-TOF MS 质谱仪, IVD 细菌标准品, 96 孔靶板购自德国 Bruker 公司; MALDI-TOF MS 基质液, 三氟乙酸, 无水乙醇, 甲酸购自美国 Sigma 公司; 血琼脂培养平板购自上海科玛嘉公司; 营养肉汤培养液购自杭州滨和试剂公司。质控菌株: 大肠埃希菌 ATCC25922, 铜绿假单胞菌 ATCC27853, 金黄色葡萄球菌 ATCC25913 和粪肠球菌 ATCC29212 购自美国 Thermo Fisher 公司。

1.3 方法 严格按照《全国临床检验操作规程》进行操作, 将每份临床标本进行常规细菌培养, 挑取可疑的单个菌落再次分纯培养。将分纯后的菌株分别在 MALDI-TOF-MS 和 PhoenixTM-100 细菌鉴定仪上进行检测。运用统计学方法分析评估两者鉴定结果的一致性。

MALDI-TOF MS 进行细菌鉴定时, 以 Bruker Biotyper 系统线性正性模式采集相对分子质量 2~20kD 的蛋白指纹图谱, 与标准数据库进行比对得出匹配分值用以判断结果。匹配分值 >2.0 为鉴

定到菌种水平, 结果高度可信。匹配分值 1.7~2.0 为鉴定到菌属水平, 结果可信。匹配分值 <1.7 为鉴定结果不可信。本次研究以匹配分值 1.7 分为界值, 未达 1.7 分视为未检出结果。

PhoenixTM-100 鉴定时须于 30min 内将鉴定板放入已用标准菌株校正过的仪器中检测。运用仪器内置的运算法则, 记录下荧光反应中颜色比率的变化, 按照每个测试周期的判读结果产生“百分比图”, 如取得足够的信息, 则给出鉴定结果。当仪器的判读结果与数据库中参考菌株的数据不一致时, 则不能给出鉴定结果。

同一临床分离菌株分别于两台仪器进行鉴定, 纳入两台仪器鉴定到同一菌属结果的菌株, 在同一菌属中对鉴定到种的菌株进行分组统计。剔除同一患者不同部位的不同菌株。

1.4 统计学分析 所有数据均使用专业统计学软件 SPSS 19.0 进行分析, 计数配对资料的比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为组间比对差异有统计学意义。

2 结果

在临床分离出的菌株中, MALDI-TOF MS 和 PhoenixTM-100 均鉴定出结果到属水平的有 1 242 株, 以克雷伯菌属和埃希菌属为主。两仪器在埃希菌属的鉴定一致率达 94.5%, 肠杆菌属的鉴定一致率较低 (21.9%), 对沙门菌属的鉴定两台仪器都无法准确鉴定到种, 见表 1。在 782 株大肠埃希菌种的鉴定上一致率达 94.5%, 310 例肺炎克雷伯菌的鉴定一致率达 84.8%, 18 例奇异变形杆菌的鉴定一致率为 100%。在 8 株肺克臭鼻亚种菌种的鉴定结果上差异有统计学意义 ($\chi^2=4.00$, $P=0.046$), 在其他种水平上的鉴定差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 1 MALDI-TOF MS 与 PhoenixTM-100 鉴定结果在属水平上的比较 [n(%)]

类别	n	检出例数		一致例数
		MALDI-TOF MS	Phoenix TM -100	
例数肠杆菌属	82	56(68.3)	44(53.7)	18(21.9)
变形杆菌属	22	21(95.4)	20(90.9)	19(86.4)
克雷伯菌属	318	289(90.9)	293(92.1)	264(83.0)
埃希菌属	784	767(97.8)	758(96.7)	741(94.5)
沙雷菌属	29	21(72.4)	23(79.3)	15(51.7)
沙门菌属	7	0(0)	0(0)	0(0)
合计	1 242	1 154(92.9)	1 138(91.6)	1 057(85.1)

3 讨论

中国 CHINET 细菌耐药性监测网和江苏省细菌耐药监测网监测结果显示, 肠杆菌科细菌虽对碳青霉烯类抗生素高度敏感, 但是 CRE 菌株的出现使总耐药率呈逐年上升趋势^[7-8]。随着临床多重耐药菌株的不断出现, 临床治疗越来越困难, 因此对

临床分离菌株的快速、准确的诊断对合理用药显得尤为重要。目前,国内对于MALDI-TOF MS和Phoenix™-100两种鉴定方法的比较并不多见,本研

究通过鉴定1 242株临床分离菌株验证鉴定结果的可靠性,并对少见菌株进行补充。

表2 MALDI-TOF MS与Phoenix™-100鉴定结果在种水平上的比较 [n(%)]

菌种	n	检出例数		一致例数 n (%)	χ^2	P
		MALDI-TOF MS	Phoenix™-100			
阴沟肠杆菌	76	50(65.8)	41(53.9)	15(19.7)	2.218	0.136
产气肠杆菌	6	6(100)	4(66.7)	4(66.7)	2.400	0.121
奇异变形杆菌	18	18(100)	18(100)	18(100)	-	-
肺炎克雷伯菌	310	285(91.9)	288(92.9)	263(84.8)	0.207	0.649
肺克臭鼻亚种	8	2(25.0)	6(75.0)	0(0)	4.000	0.046
大肠埃希菌	782	765(97.8)	756(96.7)	739(94.5)	1.937	0.164
黏质沙雷菌	29	21(72.4)	23(79.3)	15(51.7)	0.377	0.539
其他菌种	6	5(83.3)	4(66.7)	3(50)	0.444	0.505

MALDI-TOF MS对大部分细菌的检出率都很高,与传统鉴定方法比较具有较高可靠性,国内外许多学者已对其进行了评估^[9-10]。但鉴定结果易受客观因素的影响,如取材部位、菌落特性、培养方式、操作规范性等。Phoenix™-100将荧光技术和传统显色技术结合,高度自动化受客观因素的影响较小,但对菌株纯度要求较高,且鉴定时间较长。

值得注意的是,两台仪器在肠杆菌属和沙雷菌属细菌中鉴定到种的检出率均较低,其他菌属中鉴定到菌种的检出率均达90%以上。在肺克臭鼻亚种的鉴定上,Phoenix™-100准确鉴定出6株,而MALDI-TOF MS仅鉴定出了2株,可见该方法的鉴定严重依赖数据库中菌株的种类,需要实验室在日常工作中对数据库不断补充和完善^[11-12]。在沙门菌属菌株的鉴定均未能鉴定到种,临床上对沙门菌属的鉴定须与生化试验和血清学试验相结合^[13]。

在同一菌属的1 242株菌株鉴定中,MALDI-TOF MS鉴定到种的有1 154株,Phoenix™-100鉴定到种的有1 138株,两种仪器都能够满足临床常规检测需求,提供准确的鉴定结果。对部分临床少见菌株,实验室须不断更新仪器的数据库和检测方法。综上所述,两台仪器在鉴定结果上准确率高,一致性较好,均值得在临床实验室推广使用。

参考文献:

[1] SCHUBERT S, KOSTRZEWA M. MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory: current trends[J]. Current Issues in Molecular Biology, 2017, 23: 17-20.
 [2] KASSIM A, PFL GER V, PREMJI Z, et al. Comparison of biomarker based Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and conventional methods in the identification of clinically relevant bacteria and yeast[J]. BMC Microbiology, 2017, 17(1): 128.

[3] KOYUNCU OZYURT O, OZHAK B, OGUNC D, et al. Evaluation of the BD Phoenix100 system and colistin broth disk elution method for antimicrobial susceptibility testing of colistin against gram-negative bacteria[J]. Mikrobiyoloji Bulteni, 2019, 53(3): 254-261.
 [4] VOURLI S, DAFPOULOU K, VRIONI G, et al. Evaluation of two automated systems for colistin susceptibility testing of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2017, 72(9): 2528-2530.
 [5] 张艳双, 刘静, 万楠, 等. 耐碳青霉烯类肠杆菌科(CRE)耐药分子机制及控制流行的应对策略[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(2): 1-4.
 ZHANG Yanshuang, LIU Jing, WANG Nan, et al. Molecular mechanism of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae(CRE) resistance and coping strategies for controlling epidemics [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(2): 1-4.
 [6] 胡继华, 梁振刚, 郭声主, 等. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的现状研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(4): 725-728.
 HU Jihua, LIANG Zhen gang, GUO Zhusheng, et al. Research on the current situation of the carbapenems-resistant Enterobacteriaceae [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2017, 27(4): 725-728.
 [7] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2017年CHINET中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(3): 241-251.
 HU Fupin, GUO Yan, ZHU Demei, et al. Antimicrobial resistance profile of clinical isolates in hospitals across China: report from the CHINET Surveillance Program, 2017 [J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2018, 18(3): 241-251.
 [8] 程梅, 褚少朋, 张之烽, 等. 2017年江苏地区碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌的分布特点和耐药性分析[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(9): 645-649.

(下转 111 页)