

# AUTOF MS 1000 质谱鉴定系统对临床实验室 常见菌株鉴定能力的评估

沈 玲, 白 欢, 李 丽, 汪 玥, 龚 路, 孙自镛, 陈中举

(华中科技大学同济医学院附属同济医院检验科, 武汉 430030)

**摘要:** 目的 评估 Autof MS 1000 质谱鉴定系统对临床实验室常见菌株的鉴定能力。方法 参考 CLSI M52 标准对 Autof MS 1000 质谱鉴定系统进行评估。菌株鉴定的评估指标包括准确度和精密度。准确度评估以 Bruker MALDI-TOF 作为参比设备, 以 Autof MS 1000 为待评估设备, 选取 231 株能够涵盖实验室 80% ~ 90% 的常见分离菌株及 1 株室内质评菌株作为检测标本, 包括革兰氏阳性需氧菌 77 株, 革兰氏阴性需氧菌 95 株, 厌氧菌 30 株, 酵母样真菌 30 株, 待评估设备鉴定结果与参比设备鉴定结果一致时判断为相符, 若结果不一致则以测序方法 (细菌为 16S RNA, 真菌为 ITS 区测序) 鉴定结果为准。精密度评估为选取 12 株室内质控菌株和临床分离菌株作为检测标本, 在 Autof MS 1000 质谱鉴定系统上进行重复性测试, 每株菌重复检测 3 次, 判断其鉴定结果的一致性。以准确度大于 90%、精密度大于 95% 为判断合格标准。结果 232 株临床实验室常见分离菌株鉴定结果准确率为 100%; 12 株室内质控菌株和临床分离菌株重复性检测结果的精密度为 100%。结论 Autof MS 1000 质谱鉴定系统对临床实验室常见菌株鉴定的准确度和精密度都很高, 并且具有快速、低耗及易操作等优势, 建议可在临床微生物实验室推广使用。

**关键词:** Autof MS 1000; 质谱鉴定系统; 菌株鉴定

中图分类号: R446 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 03-100-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.03.026

## Evaluation of Identification Ability of Common Strain in Clinical Laboratory with AUTOF MS 1000 Mass Spectrometry Identification System

SHEN Ling, BAI Huan, LI Li, WANG Yue, GONG Lu, SUN Zi-yong, CHEN Zhong-ju

(Department of Laboratory Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**Abstract:** **Objective** To evaluate the identification ability of Autof MS1000 for the common strains in clinical laboratory. **Methods** Autof MS 1000 was evaluated followed by the reference of the CLSI M52 standard, choosing the utmost evaluation indexes of accuracy and precision. The accuracy was assessed between Autof MS1000 and Bruker MALDI-TOF, which was regarded as a reference instrument, by selecting 231 fresh clinical strains and 1 external quality assessment(EQA) strain, including 77 Gram-positive aerobic strains, 95 Gram-negative aerobic strains, 30 anaerobic strains and 30 yeast-like fungi strains, which could cover 80% to 90% of the common strains in clinical laboratory. When there was a discrepancy between above two, a third method, ribosomal 16s RNA sequencing was used to confirm the results. The precision was assessed by testing the repeatability on Autof MS1000 for three times each, by choosing 12 EQA strains, which included 4 Gram-positive aerobic strains, 6 Gram-negative aerobic strains and 2 yeast fungi strains. **Results** The conformity of the identification results of 232 common strains isolated in clinical laboratory was 100%, and the precision of the repeatability of 12 EQA strains each was 100%. **Conclusion** The accuracy was 100%, which was higher than 90% of CLSI M52 required, and also the precision is 100%, which was greater than 95% of that required. Furthermore, Autof MS1000 has the advantages of quickly and accurately identifying the strains with low cost and simple operation. It is suggested that it should be popularized in clinical laboratory.

**Keywords:** Autof MS1000; mass spectrometry identification system; strain identification

近些年来, 微生物检验新技术不断出现, 包括 GeneXpert/FilmArray、基因芯片检测、高通量测序技术 (NGS)、MALDI-TOF MS 等。MALDI-TOF

MS, 即基质辅助激光解析电离飞行时间质谱, 通过检测待检病原菌株蛋白以获取其质谱峰结果, 同时对比庞大的菌株数据库内标准菌株的蛋白质谱峰

基金项目: 湖北省自然科学基金面上项目 (2019CFB666)。

作者简介: 沈玲 (1990-), 女, 大学本科, 技师, 主要研究方向为临床微生物学检验和感染性疾病的诊断, E-mail: baobeisling@163.com。

通讯作者: 陈中举, E-mail: hailong1228@163.com。

图谱,从而实现对待测菌株的鉴定<sup>[1]</sup>。与传统微生物鉴定方法相比,MALDI-TOF MS具有操作简单、快速、灵敏度高、准确度高、高分辨率等优势,从而逐渐进入临床微生物实验室<sup>[2]</sup>,基于此,目前市面出现了诸多品牌的MALDI-TOF MS质谱分析系统,郑州安图生物工程股份有限公司生产的型号为Autof MS1000质谱鉴定系统便为其一,然而其仪器性能如何,是否可在临床实验室广泛推广,在国内尚无报道。本研究旨在评价Autof MS1000质谱鉴定系统在临床常见病原菌中的鉴定能力,从而为其能否在临床微生物实验室广泛应用提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株来源

1.1.1 准确度评估:选取华中科技大学同济医学院附属同济医院2018年6月~2019年6月231株能够涵盖实验室80%~90%的常见分离菌株和1株室间质控菌株(国家卫健委临床检验中心1705二路普雷沃菌,厌氧菌属)作为检测标本,其中革兰氏阳性需氧菌77株,革兰氏阴性需氧菌95株,厌氧菌30株,酵母样真菌30株。

1.1.2 精密度评估:选取ATCC25922大肠埃希菌等12株室内质控菌株和临床分离菌株作为检测标本,其中革兰氏阳性需氧菌4株,革兰氏阴性需氧菌6株,酵母样真菌2株。

1.2 主要仪器及试剂 德国布鲁克公司质谱鉴定系统IVD MALDI BIOTYPER及其配套试剂;郑州安图生物工程股份有限公司Autof MS1000全自动微生物质谱检测系统及其配套试剂;美国伯乐公司核糖体16S RNA测序仪及其配套试剂。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 菌株鉴定方法:

1.3.1.1 Bruker MALDI-TOF质谱鉴定系统鉴定:取冻存菌株传代两代至哥伦比亚血平板或临床分离菌株细菌均匀点种在靶板各个孔位内,使用直接涂布法或是甲酸涂布法按照仪器操作手册操作。

1.3.1.2 Autof MS1000质谱鉴定系统鉴定:取冻存菌株传代两代至哥伦比亚血平板或临床分离菌株细菌均匀点种在靶板各个孔位内,使用直接涂布法或是甲酸涂布法按照仪器操作手册操作。

1.3.1.3 核糖体16s RNA测序:取临床菌量1ml,采用煮沸法进行DNA提取;以引物PSL,UNI进行宽范围PCR扩增16s rRNA(真菌需要把its区域保守序列扩增);PCR产物纯化;上机测序,测序仪器:ABI公司的3500Dx。

#### 1.3.2 仪器评估方法

1.3.2.1 准确度评估:标准菌株和质评菌株为已检测菌株,临床分离菌株已经实验室现有鉴定设

备Bruker MALDI-TOF进行检测。对上述已检测菌株在Autof MS1000质谱鉴定系统进行鉴定,评价Autof MS1000鉴定结果与Bruker MALDI-TOF鉴定结果的符合性。鉴定可以是属的水平或种的水平,但对于关键微生物(如,肺炎链球菌),鉴定到种是至关重要的。有差异鉴定结果的分离株应使用当前的Bruker MALDI-TOF和待评价系统(Autof MS1000)进行重新检测,若依然存在差异则采用第三种方法(核糖体16s RNA测序)进行确认。

1.3.2.2 精密度评估:选取ATCC25922大肠埃希菌等12株菌在Autof MS1000质谱鉴定系统上进行重复性测试,每株菌重复检测3次。

1.3.3 结果判读:依据CLSI M52对商业化微生物鉴定系统(MIS)验证的建议,准确度超出90%,精密度超过95%即被认定为通过<sup>[3]</sup>。

## 2 结果

2.1 准确度评估 共纳入232株菌株,其中77株革兰氏阳性需氧菌,其中包括葡萄球菌属20株,肠球菌属18株,链球菌属37株,其他2株(棒杆菌属1株,李斯特氏菌属1株);95株革兰氏阴性需氧菌,其中包括肠杆菌属46株,假单胞菌属7株,不动杆菌属16株,莫拉菌属5株,嗜血杆菌属2株,气单胞菌属4株,伯克霍尔德菌属3株,木糖氧化无色小杆菌3株,嗜麦芽寡养单胞菌4株,其他5株(速生短杆菌1株,中间苍白杆菌1株,脑膜脓毒伊金氏菌1株,分散泛菌2株);30株厌氧菌,其中包括梭菌属9株,拟杆菌属12株,普雷沃菌属2株,大芬戈尔德菌2株,迟缓艾格特菌2株,其它3株(小韦荣氏球菌1株,龋齿放线菌1株,海氏嗜脓菌1株);30株酵母菌。其鉴定符合率为100%,即准确度为100%。因鉴定结果均一致,故未使用到测序方法做确证试验。

2.2 精密度评估 选取ATCC25922 ECO\*, ATCC49247 HIN, A190609196 PAE, ATCC25923 SAU, ATCC22019 CPA, B190608252 SAU, ATCC27853 PAE, A190609045 ECO\*, A190607291 SPN\*\*, ATCC49619 SPN\*\*, A190608193 ABA和F190610024 CAL(\*为大肠埃希菌/志贺菌不能区分的结果加做吡啶试验进一步确认为大肠埃希菌,\*\*为肺炎链球菌需经奥普托欣试验作进一步确认)等12株室内质控菌株和临床分离菌株进行重复性测试,每株菌检测的重复性结果均为100%,即精密度为100%。

## 3 讨论

MALDI-TOF MS质谱分析技术近年来发展迅速,在临床微生物鉴定领域,凭借其高通量、试剂成本低、操作简单、使用菌量少,且可鉴定出某些传统鉴定方法鉴定菌株种属困难的优势,而迅速走

红临床微生物实验室,大有取代传统微生物鉴定方法之趋势<sup>[2]</sup>。

郑州安图生物工程股份有限公司生产的型号为Autof MS1000的全自动微生物质谱检测系统基于MALDI-TOF MS质谱分析技术,主要用于细菌、酵母样菌、丝状真菌、分枝杆菌等菌株的检测,具有MALDI-TOF MS技术快速、准确、高通量等特点,同时拥有超过2 000菌种数据的中国本土化数据库,然而其仪器实际性能如何,是否可在临床微生物实验室广泛使用,国内尚无相关报道。鉴于此,对Autof MS1000全自动微生物质谱检测系统作出适宜的仪器性能评估显得尤为重要。本研究主要从仪器性能的准确度和精密度两个最重要的方面来对Autof MS1000全自动微生物质谱检测系统在临床微生物实验室中常见病原菌鉴定能力的评估。BESSÈDE等<sup>[4]</sup>使用MALDI TOF MS鉴定了1 013株细菌,其中986株菌被准确鉴定到种水平,其种水平鉴定准确率为97.3%;SENG等<sup>[5]</sup>运用MALDI-TOF MS鉴定了1 660株菌,其中84.1%准确鉴定到种水平,另11.3%准确鉴定到属水平,总体鉴定准确率为95.4%。在本研究中,Autof MS1000总体鉴定准确率达100%,精密度达100%,性能指标明显优于国外相关的研究数据,评估结果符合CLSI M52对商业化微生物鉴定系统(MIS)验证建议的要求<sup>[3]</sup>,亦满足临床微生物实验室对微生物鉴定的需求,建议可在临床微生物实验室推广使用。但由于本研究中纳入评估的菌株数量有限,且基本为实验室常见菌株,后续需进一步纳入大样本、罕见菌以对仪器作出更加全面可靠的性能评估。另外值得特别注意的是,由于MALDI-TOF MS技术本身的局限性,对于一些近缘种及亚种不能进行有效的区分<sup>[6]</sup>,如在本研究中,大肠埃希菌/志贺菌不能区分的结果需加做吡啶试验进一

步确认为大肠埃希菌,肺炎链球菌需经奥普托欣试验作进一步确认,实验室需充分了解其局限后,在必要时采用适当的补充实验以作进一步的区分。除病原微生物菌种鉴定领域外,随着MALDI-TOF MS技术的不断发展,其在细菌耐药性方面亦取得诸多新的成果<sup>[7]</sup>,质谱分析技术在临床微生物实验室的应用前景值得期待。

#### 参考文献:

- [1] PATEL R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases[J]. *Clinical Chemistry*, 2015, 61(1): 100-111.
- [2] SCHUBERT S, KOSTRZEWA M. MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory: current trends[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2017, 23: 17-20.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Verification of commercial microbial identification and antimicrobial susceptibility testing systems [S]. Wayne: PA, CLSI M52, 2015.
- [4] BESSÈDE E, ANGLA-GRE M, DELAGARDE Y, et al. Matrix-assisted laser-desorption/ionization biotyper: experience in the routine of a university hospital [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2011, 17(4):533-538.
- [5] SENG P, DRANCOURT M, GOURIET F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2009, 49(4): 543-551.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for the identification of cultured microorganisms using matrix-assisted laser desorption / ionization time-flight mass spectrometry [S]. Wayne: PA, CLSI M58, 2017.
- [7] 叶阿里, 张海燕, 窦亚玲, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术检测药物代谢酶基因多态性平台的建立 [J]. *现代检验医学杂志*, 2016, 31(5): 30-33.  
YE Ali, ZHANG Haiyan, DOU Yaling, et al. Establishment of MALDI TOF-MS technique platform for detecting cytochrome P450 gene polymorphism [J]. *J Mod Lab Med*, 2016, 31(5):30-33

收稿日期: 2019-12-31 修回日期: 2020-02-07

(上接第99页)

- [12] SALMON A B, RICHARDSON A, PEREZ V I. Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging?[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(5):642-655.
- [13] ZINI A, PHILLIPS S, COURCHESNE A, et al. Bissonnette morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay [J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(6):2495-2500.
- [14] NI K, STEGER K, YANG Hao, et al. A comprehensive investigation of sperm DNA damage and oxidative stress injury in infertile patients with subclinical, normozoospermic, and astheno/oligozoospermic clinical varicocele[J]. *Andrology*, 2016, 4(5):816-824.
- [15] XIE Deng'e, LU Chen, ZHU Ying, et al. Analysis on

the association between sperm DNA fragmentation index and conventional semen parameters, blood microelements and seminal plasma ROS in male patients with infertility[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(6):5173-5176.

- [16] MORRIS I D, ILOTT S, DIXON L, et al. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development[J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(4):990-998.
- [17] EDUARDO C, DIANA A. Mechanistic investigation of ROS-induced DNA damage by oestrogenic compounds in lymphocytes and sperm using the comet assay[J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(5):2783-2796.

收稿日期: 2019-12-13 修回日期: 2020-02-09