

血培养阳性标本分离胶促凝管联合 SDS 前处理与 固体培养基短时培养菌膜应用 MALDI-TOF MS 快速鉴定最佳时间探讨

范 宁^a, 段雪红^a, 杨 瑜^a, 王媛媛^a, 鱼丽萍^b, 谢立民^a, 王 苗^a

(咸阳市第一人民医院 a. 检验科; b. 神经内科, 陕西咸阳 712000)

摘要:目的 探讨血培养阳性标本分离胶促凝管联合十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)前处理与固体培养基短时培养菌膜应用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)快速鉴定的最佳时间。方法 收集2020年8月~2021年1月来源于咸阳市第一人民医院微生物室的243瓶血培养阳性(单数菌)样本,采用MALDI-TOF MS技术对分离胶促凝管联合SDS前处理标本直接鉴定,同时对固体培养基短时培养(6h内)菌膜鉴定,以传统培养(24h)方法鉴定结果为金标准,分析MALDI-TOF MS快速鉴定血培养阳性菌株的最佳方法和时间。结果 243瓶血培养阳性标本共鉴定出病原菌44种,分离率前五位的细菌为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌。SDS前处理法直接鉴定总符合率为75.72%(184/243),其中革兰阴性菌和革兰阳性菌符合率分别为84.97%(130/153)和60.00%(54/90);固体培养基生长2h、4h和6h的菌膜鉴定总符合率依次为44.44%(108/243)、72.02%(175/243)和90.53%(220/243),其中革兰阴性菌依次为59.48%(91/153)、83.01%(127/153)和92.81%(142/153),革兰阳性菌依次为18.89%(17/90)、53.33%(48/90)和86.67%(78/90)。金黄色葡萄球菌SDS前处理法直接鉴定和2h、4h生长菌膜鉴定符合率均高于凝固酶阴性葡萄球菌($\chi^2=4.795, 12.083, 9.035$, 均 $P<0.01$)。革兰阴性菌SDS前处理法直接鉴定和2h、4h生长菌膜鉴定符合率均高于革兰阳性菌($\chi^2=17.880, 37.808, 24.758$, 均 $P<0.01$)。结论 MALDI-TOF MS可对血流感染(bloodstream infection, BSI)主要病原菌进行快速直接鉴定,根据革兰染色结果联合固体培养基短时培养菌膜鉴定,可进一步缩短细菌鉴定时间,为临床抗感染治疗提供早期依据。

关键词: 血流感染; 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱; 分离胶促凝管; 十二烷基硫酸钠; 血培养
中图分类号: Q503; R446.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414(2022)05-132-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.05.026

Discussion on the Best Time of Blood Culture Positive Samples for Rapid Identification by MALDI-TOF MS Using Separation Gel Accelerating Tube Combined with SDS Pretreatment and Short-term Culture of Biofilm on Solid Medium

FAN Ning^a, DUAN Xue-hong^a, YANG Yu^a, WANG Yuan-yuan^a, YU Li-ping^b, XIE Li-min^a, WANG Miao^a

(a. Department of Clinical Laboratory; b. Department of Neurology, Xianyang First People's Hospital, Shaanxi Xianyang 712000, China)

Abstract: Objective To explore the best time for rapid identification of blood culture positive samples by matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) using separation gel coagulation promoting tube combined with sodium dodecyl sulfate (SDS) pretreatment and short-term culture of bacterial membrane in solid medium. **Methods** 243 bottles of blood culture positive (singular bacteria) samples from Department of Clinical Laboratory, Xianyang First People's Hospital from August 2020 to January 2021 were collected. The samples pretreated by gel promoting tube combined with SDS were directly identified by MALDI-TOF MS technology. At the same time, the bacterial membrane was identified by short-term culture in solid medium (within 6h). The identification results of traditional culture (24h) method were taken as the gold standard to analyze the best method and time for rapid identification of blood culture positive strains by

基金项目: 咸阳市2020年重点研发计划(2020k02-106)。

作者简介: 范宁(1973-),女,本科,主任技师,主要从事临床微生物检验及细菌耐药性研究, E-mail: 330464724@qq.com。

通讯作者: 杨瑜(1984-),女,主管技师,主要从事临床微生物及免疫学检验工作, E-mail: 2191487760@qq.com。

MALDI-TOF MS. Results A total of 44 kinds of pathogenic bacteria were identified in 243 blood culture positive samples. The top five bacteria were *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. The total coincidence rate of direct identification by SDS pretreatment method was 75.72% (184 / 243), of which the coincidence rates of Gram-negative bacteria and Gram-positive bacteria were 84.97% (130 / 153) and 60.00% (54 / 90), respectively. The total coincidence rates of bacterial membrane identification in solid medium grown for 2h, 4h and 6h were 44.44% (108 / 243), 72.02% (175 / 243) and 90.53% (220 / 243), respectively. Among them Gram negative bacteria were successively 59.48% (91 / 153), 83.01% (127 / 153) and 92.81% (142 / 153), respectively, and Gram positive bacteria were successively 18.89% (17 / 90), 53.33% (48 / 90) and 86.67% (78 / 90), respectively. The coincidence rates between SDS pretreatment identification and identification of biofilm after growing for 2h and 4h for *Staphylococcus aureus* were higher than those of coagulase negative *Staphylococcus* ($\chi^2=4.795, 12.083, 9.035$, all $P < 0.01$). For Gram-negative bacteria were higher than those of Gram-positive bacteria, the differences were statistically significant ($\chi^2=17.880, 37.808, 24.758$, all $P < 0.01$).

Conclusion MALDI-TOF MS can quickly and directly identify the main pathogens of blood flow infection. According to the results of Gram staining combined with short-term culture of bacterial membrane in solid medium, the identification time can be further shortened, the identification accuracy can be improved, and the needs of early clinical etiological diagnosis and timely intervention of blood flow infection can be basically met.

Keywords: bloodstream infection; matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry; separation geltubes; sodium dodecyl sulfate; blood culture

血流感染 (blood stream infection, BSI) 是一种严重的全身感染性疾病, 发病率较高, 可导致机体多器官功能障碍, 严重者发生休克甚至死亡^[1]。血培养是 BSI 诊断的金标准, 快速、准确地确定病原菌信息, 及时对症用药是临床治疗 BSI 的关键^[2]。若在起病初期 24 ~ 48h 内进行有效地抗生素治疗, 可明显降低 BSI 的病死率^[3]。然而, 目前的血培养检验流程中, 血培养瓶报阳后, 仍需 36 ~ 48h 才能得到最终的菌种鉴定报告^[4]。近年来, 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 技术已应用于血培养阳性标本的直接鉴定。但由于标本前处理过程较复杂、不同菌种鉴定符合率有明显差异, 使其不能完全取代固体培养基的传代培养。因此, 本文针对阳性血培养, 采用 MALDI-TOF MS 技术对分离胶促凝管联合十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 前处理标本直接鉴定与固体培养基短时培养菌膜鉴定相结合, 探讨血培养阳性标本中不同菌种快速鉴定的最佳时间。

1 材料和方法

1.1 研究对象 收集 2020 年 8 月 ~ 2021 年 1 月来源于咸阳市第一人民医院微生物室的 243 瓶血培养阳性样本进行分析。入选标准: BacT/ALERT 3D 全自动血培养仪发出阳性报警, 阳性瓶经常规涂片革兰染色镜检确认为一种形态的细菌。排除标准: 报阳血培养瓶经常规涂片革兰染色镜检发现多种形态细菌和 / 或真菌。如同一患者同时多瓶血培养报阳, 取最先报阳的血培养标本进行检验。

1.2 仪器与试剂 BacT/ALERT 3D 全自动血培

养仪, VITEK MS 微生物质谱检测系统, VITEK 2 Compact 微生物鉴定及药敏分析系统 (法国 BioMérieux 公司); 哥伦比亚血琼脂平板和麦康凯平板 (郑州安图生物工程股份有限公司); 血培养瓶, MS P96 孔靶板和 CHCA 基质液, 甲酸和乙腈 (法国 BioMérieux 公司); 十二烷基硫酸钠和乙醇 (天津市天力化学试剂有限公司); 革兰染色液 (珠海贝索生物技术有限公司); 分离胶促凝管 (江苏康捷医疗器械有限公司); 大肠埃希菌 (ATCC 8739) 由法国生物梅里埃公司提供。

1.3 方法

1.3.1 传统方法: BacT/ALERT 3D 全自动血培养仪中的血培养瓶报阳后, 转种哥伦比亚血琼脂平板和麦康凯平板, 经 35 °C, 5ml/dl CO₂ 环境培养 24h, 取纯菌落, 采用 VITEK MS 或 VITEK 2 Compact 鉴定, 并以此结果为金标准, 比较 SDS 前处理和固体培养基短时培养应用 MALDI-TOF MS 鉴定的符合率。

1.3.2 分离胶促凝管联合 SDS 前处理后 MALDI-TOF MS 直接鉴定: 标本前处理参照周春妹等^[5]报道分离胶促凝管联合 SDS 方法。MALDI-TOF MS 鉴定按照 VITEK MS 操作程序进行。

1.3.3 固相培养基短时培养生长菌膜鉴定: 取 0.5ml 血培养阳性样本转种于哥伦比亚血琼脂平板上密集划线, 置 35 °C, 5ml/dl CO₂ 环境培养。分别取 2h, 4h 和 6h 培养的菌膜采用 VITEK MS 鉴定。

1.4 统计学分析 实验数据应用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。SDS 前处理法直接鉴定和固体培养基短时菌膜鉴定符合率比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SDS 前处理法直接鉴定与固体培养基短时培养菌膜鉴定结果 见表1、表2。243例单一菌血培养标本,经传统方法培养鉴定,分别为23种革兰

阴性菌153株(62.96%)和21种革兰阳性菌90株(37.04%)。分离率前五位的细菌分别为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌。

表1 243例单数菌 SDS 前处理法直接鉴定与固体培养基短时培养菌膜鉴定结果

菌名	株数	SDS 前处理法直接鉴定			固体培养基短时培养菌膜鉴定		
		鉴定正确	未鉴定出	鉴定错误	2h	4h	6h
大肠埃希菌	56	50	6	0	39	53	56
肺炎克雷伯菌	25	25	0	0	16	23	25
阴沟肠杆菌	10	10	0	0	7	10	10
克氏柠檬酸杆菌	4	3	0	1	1	3	4
产酸克雷伯菌	4	4	0	0	3	4	4
黏质沙雷菌	2	2	0	0	2	2	2
聚团泛菌	3	1	2	0	0	0	1
奇异变形杆菌	1	1	0	0	1	1	1
摩根摩根菌	1	1	0	0	1	1	1
肠沙门菌肠亚种	1	1	0	0	1	1	1
铜绿假单胞菌	20	20	0	0	14	19	20
医院不动杆菌	5	2	3	0	0	2	5
鲍曼不动杆菌	4	4	0	0	2	3	4
恶臭假单胞菌	2	0	1	1	0	0	1
水生丛毛单胞菌	1	0	1	0	0	0	1
皮特不动杆菌	1	1	0	0	1	1	1
门多萨假单胞菌	1	1	0	0	1	1	1
洋葱伯克霍尔德菌	1	1	0	0	0	0	1
溶血不动杆菌	1	1	0	0	1	1	1
嗜麦芽窄食单胞菌	1	1	0	0	1	1	1
马耳他布鲁菌	6	0	6	0	0	0	0
嗜水气单胞菌	2	1	1	0	0	1	1
温和气单胞菌	1	0	1	0	0	0	0
金黄色葡萄球菌	17	12	5	0	7	14	17
表皮葡萄球菌	17	3	14	0	0	7	14
人葡萄球菌	13	5	8	0	0	2	12
溶血葡萄球菌	4	4	0	0	0	2	3
头葡萄球菌	4	3	1	0	0	2	3
科氏葡萄球菌	2	0	2	0	0	2	2
路邓葡萄球菌	1	1	0	0	1	1	1
屎肠球菌	8	7	1	0	2	3	6
粪肠球菌	5	3	2	0	2	5	5
肺炎链球菌	5	4	1	0	1	4	5
缓症链球菌	2	1	1	0	0	1	1
副血链球菌	1	1	0	0	0	0	1
星座链球菌	1	0	1	0	0	0	1
咽峡炎链球菌	1	1	0	0	0	0	0
停乳链球菌	1	1	0	0	0	0	1
无乳链球菌	1	1	0	0	0	1	1
阴道加德纳菌	3	3	0	0	2	2	2
藤黄微球菌	1	1	0	0	1	1	1
纹带棒状杆菌	1	1	0	0	0	0	0
单核细胞增生李斯特菌	1	1	0	0	1	1	1
溶血隐秘杆菌	1	1	0	0	0	0	1
总计	243	184	57	2	108	175	220

表2 各菌属 SDS 前处理法直接鉴定与固体培养基短时培养菌膜鉴定结果及符合率 [n (%)]

菌名	株数	SDS 前处理法直接鉴定			固体培养基短时培养菌膜鉴定		
		鉴定正确	未鉴定出	鉴定错误	2h	4h	6h
肠杆菌科	107	98(91.59)	8(7.48)	1(0.93)	71(66.36)	98(91.59)	105(98.13)
非发酵菌	37	31(83.78)	5(13.51)	1(2.71)	20(54.05)	28(75.68)	36(97.30)
其他 G ⁻ 菌	9	1(11.11)	8(88.89)	0	0	1(11.11)	1(11.11)
葡萄球菌属	58	28(48.28)	30(51.72)	0	8(13.79)	30(51.72)	52(89.66)
肠球菌属	13	10(76.92)	3(23.08)	0	4(30.77)	8(61.54)	11(84.62)
链球菌属	12	9(75.00)	3(25.00)	0	1(8.33)	6(50.00)	10(83.33)
其他 G ⁺ 菌	7	7(100)	0	0	4(57.14)	4(57.14)	5(71.43)
总计	243	184(75.72)	57(23.46)	2(0.82)	108(44.44)	175(72.02)	220(90.53)

2.2 革兰阳性菌 (G⁺ 菌) 和革兰阴性菌 (G⁻ 菌) SDS 前处理法直接鉴定与固体培养基短时培养菌膜鉴定符合率 见表3。革兰阳性菌中, SDS 前处理法直接鉴定未鉴定出 36 株 (40.00%, 36/90), 以葡萄球菌属最多 (30 株), 其中 83.33% (25/30) 为凝固酶阴性葡萄球菌。少见菌阴道加德纳菌、藤黄微球菌、纹带棒状杆菌、单核细胞增生李斯特菌及溶血隐秘杆菌全部正确鉴定到种。

革兰阴性菌中, SDS 前处理法直接鉴定错误 2 株 (1.31%, 2/153), 为克氏柠檬酸杆菌和恶臭假单胞菌各 1 株。3 株聚团泛菌鉴定结果较差, MALDI-TOF MS 直接鉴定和 6h 菌膜分别鉴定正确 1 株; 水生丛毛单胞菌仅 6h 生长菌膜鉴定正确, 恶臭假单胞菌 6h 生长菌膜符合率为 50% (1/2); 6 株马耳他布鲁菌两种鉴定方法均无结果, 延长培养至 8h 可正确鉴定到属。

除 6h 培养菌膜外, SDS 前处理法直接鉴定和 2h, 4h 生长菌膜鉴定, 革兰阴性菌符合率均高于革兰阳性菌, 差异有统计学意义 ($\chi^2=17.880 \sim 37.808$, 均 $P<0.01$)。

表3 G⁻ 菌和 G⁺ 菌 SDS 前处理法直接鉴定与固体培养基短时培养菌膜鉴定符合率 (%) 比较

标本处理方法	G ⁺ 菌 ($n=90$)	G ⁻ 菌 ($n=153$)	χ^2 值	P 值
SDS 前处理法	60.00	84.97	17.880	0.000
短时培养	2h	18.89	59.48	37.808
	4h	53.33	83.01	24.758
	6h	86.67	92.81	2.496

2.3 肠杆菌和非发酵菌 SDS 前处理法直接鉴定与固体培养基短时培养菌膜鉴定符合率 见表4。肠杆菌鉴定符合率均高于非发酵菌, 仅 4h 培养菌膜鉴定比较差异具有统计学意义 ($\chi^2=4.993$, $P<0.05$),

其余差异均无统计学意义。

表4 肠杆菌和非发酵菌 SDS 前处理法直接鉴定与固体培养基短时培养菌膜鉴定符合率 (%) 比较

标本处理方法	肠杆菌科 ($n=107$)	非发酵菌 ($n=37$)	χ^2 值	P 值
SDS 前处理法	91.59	83.78	1.056	0.304
短时培养	2h	66.36	54.05	1.789
	4h	91.59	75.68	4.993
	6h	98.13	97.30	0.000

2.4 主要革兰阳性菌 SDS 前处理法直接鉴定与固体培养基短时培养菌膜鉴定符合率 肠球菌属、链球菌属、葡萄球菌属 SDS 前处理法直接鉴定与固体培养基短时培养菌膜鉴定符合率比较见表5。金黄色葡萄球菌与凝固酶阴性葡萄球菌鉴定符合率比较见表6。

表5 主要革兰阳性菌 SDS 前处理法直接鉴定与固体培养基短时培养菌膜鉴定符合率 (%) 比较

标本处理方法	肠球菌属 ($n=13$)	链球菌属 ($n=12$)	葡萄球菌属 ($n=58$)	χ^2 值	P 值
SDS 前处理法	76.92	75.00	48.28	5.477	0.065
短时培养	2h	30.77	8.33	13.79	2.887
	4h	61.54	50.00	51.27	2.979
	6h	84.62	83.33	89.66	1.651

表6 金黄色葡萄球菌和凝固酶阴性葡萄球菌 SDS 前处理法直接鉴定与固体培养基短时培养菌膜鉴定符合率 (%) 比较

标本处理方法	金黄色葡萄球菌 ($n=17$)	凝固酶阴性葡萄球菌 ($n=41$)	χ^2 值	P 值
SDS 前处理法	70.59	39.02	4.795	0.029
短时培养	2h	41.18	2.44	12.083
	4h	82.35	39.02	9.035
	6h	100.00	85.37	1.421

金黄色葡萄球菌 SDS 前处理法直接鉴定和 2h, 4h 生长菌膜鉴定符合率均高于凝固酶阴性葡萄球菌, 差异有统计学意义 ($\chi^2=4.795, 12.083, 9.035$, 均 $P < 0.01$)。

3 讨论

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术 (MALDI-TOF MS) 是目前微生物实验室的常用工具, 可显著缩短病原菌的鉴定时间^[6]。与传统方法相比, 通过 MALDI-TOF MS 从阳性血培养标本中直接鉴定微生物, 可明显缩短鉴定时间^[7]。此方法需要对样品进行浓缩和纯化, 包括离心和洗涤、选择性裂解血细胞、血清分离或过滤等过程。目前, 国外已有三个主要的商品试剂盒^[8]用于血培养阳性标本的前处理。

虽然商品试剂盒易于标准化, 但由于试剂盒成本高等原因, 国内实验室多采用自制试剂用于血液标本的处理^[2,5, 9-12]。本研究参考周春妹等^[5]分离胶管联合 SDS 改良法处理标本, 采用 MALDI-TOF MS 直接鉴定, 结果与文献^[5]比较, 革兰阳性菌的符合率较低, 其它结果基本一致。主要为凝固酶阴性葡萄球菌鉴定符合率低, 这与侯伟伟等^[2]的研究结果一致, 高于方毅等^[13]的结果。总符合率与分离胶管联合 Bruker 质谱直接鉴定^[3,10,14]结果也一致。分离率前五位的细菌除表皮葡萄球菌外, 其余四种菌直接鉴定符合率均大于 70%, 其中肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌为 100%。可见, 采用自制试剂处理标本, 通过 MALDI-TOF MS 技术, 可准确鉴定血流感染的主要病原菌。

美国运用溶解过滤法处理标本, 同时使用处理后过滤器上的细菌直接制备菌悬液, 联合 VITEK 2 Compact 进行药敏试验, 使得血培养瓶报阳到鉴定及药敏试验的中位时间缩短至 9.9h^[15]。BROYER 等^[6]通过自动化处理, 实现了靶板制备的标准化, 提高了种鉴定水平, 同时可“按需”和“小批量”操作, 节省了时间和人力。谷钰峰等^[16]将 MALDI-TOF MS 技术与流式细胞学联合应用于 BSI 病原体的快速鉴定及药敏试验, 使得报告时间更缩短至 3h 以内。自动化的标本前处理操作, 可显著提高 MALDI-TOF MS 直接鉴定血培养阳性标本的准确率, 联合前处理纯化菌液快速药敏试验可为临床抗感染治疗提供更快更可靠的依据。

不同菌种, SDS 前处理法 MALDI-TOF MS 直接鉴定的符合率存在差异。总的来说, 革兰阴性菌高于革兰阳性菌, 原因可能为血培养中革兰阳性菌污染概率大于革兰阴性菌, 而污染菌的菌量比较少, 且革兰阳性菌有较厚的难被破坏的细胞壁, 从而导致 VITEK MS 直接法鉴定准确率低^[2]。凝

固酶阴性葡萄球菌的鉴定符合率明显低于金黄色葡萄球菌, 对于二者具有一定的鉴别诊断意义^[11]。HAMILTON 等^[17]研究结果显示, 对于血培养中未能直接鉴定的葡萄球菌, 在低风险或低流行率地区, 可排除金黄色葡萄球菌菌血症。林晓晖等^[18]利用 VITEK MS 的 Launch pad 软件对细菌所产生的质谱峰质荷比 (M/Z) 进行分析, 可快速鉴别甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 及甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), 为抗感染治疗提供更精准的依据。

由于血培养报阳时间不一致, 批处理不能实现快速鉴定, 单独处理样本相对费时费力。加之凝固酶阴性葡萄球菌、某些革兰阴性菌及一些少见菌等, SDS 前处理法直接鉴定效果不佳, 故本研究同时利用 MALDI-TOF MS 鉴定血平板上短时生长菌膜, 以进一步缩短阳性血培养鉴定时间和鉴定符合率。

文献^[19]报道, 血培养阳性标本中的革兰阴性杆菌采用 MALDI-TOF MS 成功鉴定菌种的平均时间仅为 2.0h, 而革兰阳性球菌为 5.9h。本研究结果显示, 革兰阴性菌 2h 菌膜鉴定符合率为 59.48%, 低于直接鉴定结果; 而革兰阳性菌 6h 菌膜鉴定符合率达 86.67%, 高于直接鉴定结果。故对于革兰阴性菌本研究结果直接鉴定效果更佳, 而革兰阳性菌 6h 菌膜鉴定符合率更高。二者 4h 菌膜鉴定符合率与 MALDI-TOF MS 直接鉴定的数据接近, 其中肠杆菌科细菌与金黄色葡萄球菌的鉴定符合率最高, 非发酵菌低于肠杆菌, 可能与其在固体培养基生长相对较慢有关。6h 生长菌膜与吴富炜等^[20]的研究结果一致, 高于 HA 等^[21]的研究结果。周道红等^[22]报道革兰阳性菌 4h 菌膜与革兰阴性菌 2h 菌膜鉴定结果均高于本研究, 可能与病原菌数量及菌种分布有关。

相比于 MALDI-TOF MS 直接鉴定, 固体培养基短时生长菌膜质谱鉴定不需要特殊试剂和标本处理, 可通过随时查看培养基上菌膜生长状态即时鉴定, 更适宜对单个或小批量样本的鉴定。结合本研究结果及血液培养技术用于 BSI 诊断临床实践专家共识^[23], 本研究团队建议: ①血培养报阳后首选 MALDI-TOF MS 直接鉴定, 约 85% 的革兰阴性菌及 60% 的革兰阳性菌可在 1~2h 内被准确鉴定到种; ②对于鉴定失败的革兰阳性球菌, 直接选择 6h 生长菌膜进行鉴定, 因为 2h 和 4h 生长菌膜鉴定符合率并不优于直接鉴定。对于鉴定失败的葡萄球菌, 若本地区金黄色葡萄球菌 BSI 率较低, 可提示临床金黄色葡萄球菌感染的可能性不大。③对于未能进

行直接鉴定的标本,革兰阴性菌可选择2h生长菌膜进行鉴定,如失败再对4h生长菌膜进行鉴定。革兰阳性球菌则培养至4h鉴定,如失败再对6h生长菌膜进行鉴定;④报阳时长大于2天且曲线平缓者建议直接选择6h生长菌膜鉴定,如报阳曲线及涂片结果疑似布鲁菌,则培养至8h再鉴定。

MALDI-TOF MS已被证明是一种快速、可靠的直接鉴定血培养瓶中病原体的方法^[24]。本研究结果表明,MALDI-TOF MS技术可对BSI主要病原菌进行快速直接鉴定,根据革兰染色结果联合固体培养基短时培养生长菌膜质谱鉴定,可进一步缩短细菌鉴定时间,为临床抗感染治疗提供早期依据。

参考文献:

- [1] 丁毅伟,吴思敏,韩志海.血流感染细菌快速鉴定及药敏试验的方法学评价[J].解放军医学杂志,2021,46(5):468-473.
DING Yiwei, WU Simin, HAN Zhihai. Methodological evaluation of rapid identification and drug susceptibility testing of bloodstream infection bacteria [J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2021, 46(5):468-473.
- [2] 侯伟伟,江涟,李冬.MALDI-TOF MS直接鉴定血培养阳性病原的临床应用[J].检验医学,2021,36(4):424-429.
HOU Weiwei, JIANG Lian, LI Dong. Clinical application of Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in the direct detection of blood culture positive specimens [J]. Laboratory Medicine, 2021, 36 (4): 424-429.
- [3] 张菲菲,王启,李荷楠,等. Sepsityper Kit试剂盒法或血清分离胶法联合MALDI-TOF MS快速鉴定血培养阳性病原菌[J].中华微生物学和免疫学杂志,2018,38(2):111-115.
ZHANG Feifei, WANG Qi, LI Henan, et al. Rapid identification of pathogenic organisms positive for blood culture by MALDI-TOF mass spectrometry in combination with Sepsityper Kit or serum-separating gel tubes [J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2018, 38 (2): 111-115.
- [4] 宋启飞,刘敏雪,李梦娇,等.质谱快速鉴定血培养阳性标本的方法研究[J].中国现代医学杂志,2018,28(35):23-26.
SONG Qifei, LIU Minxue, LI Mengjiao, et al. Establishment of a method of rapid identification of positive blood culture samples by MALDI-TOF MS [J]. China Journal of Modern Medicine, 2018, 28 (35): 23-26.
- [5] 周春妹,沈佳瑾,黄声雷,等.评估SDS在MALDI-TOFMS直接鉴定阳性血培养样本中的应用价值[J].检验医学,2018,33(3):228-232.
ZHOU Chunmei, SHEN Jiajin, HUANG Shenglei, et al. SDS for improving direct identification of microorganisms in positive blood culturing by MALDI-TOF MS [J]. Laboratory Medicine, 2018, 33 (3): 228-232.
- [6] BROYER P, PERROT N, ROSTAING H, et al. An automated sample preparation instrument to accelerate positive blood cultures microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry (Vitek®MS) [J]. Front Microbiol, 2018, 9:911.
- [7] KAYIN M, MERT B, AYDEMIR S, et al. Comparison of rapid BACpro® II, Sepsityper® kit and in-house preparation methods for direct identification of bacteria from blood cultures by MALDI-TOF MS with and without Sepsityper® module analysis [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2019, 38(11):2133-2143.
- [8] CHEN Xinfei, HOU Xin, XIAO Meng, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis for the identification of pathogenic microorganisms: A review [J]. Microorganisms, 2021, 9(7):1536.
- [9] 吴彩霞,高玉芳,郭梦,等.基质辅助激光解析电离飞行时间质谱在血流感染快速鉴定中的应用[J].甘肃科学学报,2019,31(4):66-69.
WU Caixia, GAO Yufang, GUO Meng, et al. Application of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry in rapid identification of blood flow infection [J]. Journal of Gansu Sciences, 2019, 31(4):66-69.
- [10] 陈峰,李媛睿,皇甫昱婵,等.分离胶促凝管联合MALDI-TOF MS直接检测血培养阳性细菌[J].检验医学,2015,30(2):113-121.
CHEN Feng, LI Yuanrui, HUANGFU Yuchan, et al. Direct identification of microorganisms from blood culture by MALDI-TOF MS combined with separation gel tube [J]. Laboratory Medicine, 2015, 30 (2): 113-121.
- [11] 马坚,俞万钧,胡必杰,等.通过基质辅助激光解析电离飞行时间质谱系统直接快速鉴定阳性血培养[J].中华医院感染学杂志,2017,27(12):2676-2679.
MA Jian, YU Wanjuan, HU Bijie, et al. Rapid method for direct identification of bacteria in blood culture broth using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2017, 27 (12): 2676-2679.
- [12] 王军杰,马冰,李轶,等.质谱技术直接鉴定报阳血培养细菌可行性分析[J].检验医学,2020,35(7):716-720.
WANG Junjie, MA Bing, LI Yi, et al. Identification of bacteria directly by MALDI-TOF MS [J]. Laboratory Medicine, 2020, 35 (7): 716-720.
- [13] 方毅,张景皓,赵虎.分离胶与快速培养富集法在MALDI-TOF MS快速检测报阳血培养样本的方法学比较[J].老年医学与保健,2018,24(6):705-708, 761.
FANG Yi, ZHANG Jinghao, ZHAO Hu. Methodological comparison of separation gel tube and rapid culture in direct identification of bacteria from positive blood cultures by MALDI-TOF MS [J]. Geriatrics & Health Care, 2018, 24 (6): 705-708, 761.
- [14] 余佳佳,李媛睿,刘瑛.SDS和SAP前处理联合MALDI-TOF MS在报阳血培养样本快速病原菌鉴定中的价值[J].检验医学,2021,36(8):864-868.
YU Jiajia, LI Yuanrui, LIU Ying. MALDI-TOF MS combined with SDS and SAP pretreatment for rapid

- identification of positive blood culture [J]. *Laboratory Medicine*, 2021, 36(8): 864-868.
- [15] MACHEN A, DRAKE T, WANG Y F. Same day identification and full panel antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood culture bottles made possible by a combined lysis-filtration method with MALDI-TOF VITEK mass spectrometry and the VITEK2 system [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e87870.
- [16] 谷钰峰, 李昱, 张晓录, 等. 基于 MALDI-TOF MS 与 FCM 联合应用对临床血流感染病原体鉴定和药敏试验新方法的建立和应用 [J]. *现代检验医学杂志*, 2018, 33(4): 20-24.
- GU Yufeng, LI Yu, ZHANG Xiaolu, et al. A new method aimed to quickly identify pathogen and drug susceptibility test based on MALDI-TOF MS combined with FCM [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2018, 33(4): 20-24.
- [17] HAMILTON F, EVANS R, MACGOWAN A. The value of MALDI-TOF failure to provide an identification of *Staphylococcal* species direct from blood cultures and rule out *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a post-hoc analysis of the RAPIDO trial [J]. *Access Microbiol*. 2020, 3(2): 000192.
- [18] 林晓晖, 麦惠香, 简梦华, 等. 梅里埃 VITEK MS 质谱仪在甲氧西林耐药及敏感的金黄色葡萄球菌快速鉴定的应用研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2020, 35(5): 121-123.
- LIN Xiaohui, MAI Huixiang, JIAN Menghua, et al. Study on VITEK MS mass spectrometer rapid identification of methicillin resistance and sensitive *Staphylococcus aureus* [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2020, 35(5): 121-123.
- [19] IDELEVICH EA, REISCHL U, BECKER K. New microbiological techniques in the diagnosis of bloodstream infections [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2018, 115(49): 822-832.
- [20] 吴富伟, 王圆圆, 杨靖娴. 短时固相培养法联合 MALDI-TOF MS 快速鉴定含活性炭阳性血培养标本 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2020, 27(12): 2176-2180.
- WU Fuwei, WANG Yuanyuan, YANG Jingxian. The rapid identification of microorganisms from positive blood culture containing charcoal by MALDI-TOF MS after short-term incubation on solid medium [J]. *Labeled Immunoassays and Clinical Medicine*, 2020, 27(12): 2176-2180.
- [21] HA J, HONG S K, HAN G H, et al. Same-day identification and antimicrobial susceptibility testing of bacteria in positive blood culture broths using short-term incubation on solid medium with the MicroFlex LT, Vitek-MS, and Vitek2 Systems [J]. *Ann Lab Med*. 2018, 38(3): 235-241.
- [22] 周道红, 黎敏, 鲁卫平. 利用 MALDI-TOF MS 快速鉴定经固体培养基短时培养的阳性血培养物中的病原菌 [J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(22): 2746-2749, 2755.
- ZHOU Daohong, LI Min, LU Weiping. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF Mass Spectrometry following short-term incubation on solid medium [J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2018, 39(22): 2746-2749, 2755.
- [23] 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会, 中华医学会检验医学分会临床微生物学组, 中华医学会微生物学和免疫学分会临床微生物学组. 血液培养技术用于血流感染诊断临床实践专家共识 [J]. *中华检验医学杂志*, 2022, 45(2): 105-121.
- Society of Clinical Microbiology and Infection of China International Exchange and Promotion Association for Medical and Healthcare, Clinical Microbiology Group of the Laboratory Medicine Society of the Chinese Medical Association, Clinical Microbiology Group of the Microbiology and Immunology Society of the Chinese Medical Association. Chinese expert consensus on the clinical practice of blood culture in the diagnosis of bloodstream infection [J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2022, 45(2): 105-121.
- [24] YUAN Youhua, WANG Junjie, ZHANG Jiangfeng, et al. Evaluation of an optimized method to directly identify bacteria from positive blood cultures using MALDI-TOF mass spectrometry [J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(4): e23119.

收稿日期: 2022-01-20

修回日期: 2022-05-27

(上接第131页)

- [15] MORT J S, RECKLIES A D. Interrelationship of active and latent secreted human cathepsin B precursors [J]. *The Biochemical Journal*, 1986, 233(1): 57-63.
- [16] FANG Wenqian, DENG Zhiyong, BENADJAOUD F, et al. Cathepsin B deficiency ameliorates liver lipid deposition, inflammatory cell infiltration, and fibrosis after diet-induced nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Translational Research*, 2020, 222(8): 28-40.
- [17] 段娟娟, 张启芳, 黄宗华, 等. 组织蛋白酶 B 通过瞬时受体电位黏蛋白-1 对核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 炎症小体活化的影响 [J]. *中国医学科学院学报*, 2019, 41(2): 208-215.
- DUAN Juanjuan, ZHANG Qifang, HUANG Zonghua, et al. Cathepsin B affects the activation of nucleotide-binding domain and leucine-rich-repeat-containing family and pyrin domain-containing 3 inflammasome via transient receptor potential mucolipin-1 [J]. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 2019, 41(2): 208-215.
- [18] 程成, 林鹏. 日本囊对虾 Cathepsin B 基因在不同卵巢发育时期的表达 [J]. *生物技术通报*, 2014, 10(11): 159-163.
- CHENG Cheng, LIN Peng. The expression of cathepsin B in the different ovary development stages of *Marsupenaeus Japonicus* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014, 10(11): 159-163.

收稿日期: 2021-04-09

修回日期: 2021-05-25