

# 快速前处理结合MALDI-TOF MS在血流感染病原菌直接鉴定中的研究进展

严 雄, 郭 民\*, 李海顺

昆明医科大学第五附属医院检验科, 云南 个旧

收稿日期: 2023年11月13日; 录用日期: 2023年12月22日; 发布日期: 2023年12月29日

## 摘 要

目的: 对快速前处理结合MALDI-TOF MS在血流感染病原菌直接鉴定中的研究进展进行综述。方法: 作者通过查阅中外关于快速前处理结合MALDI-TOF MS在直接鉴定血流感染病原菌的相关文献, 综述其研究背景、研究现状等。结果: MALDI-TOF MS技术在血流感染病原菌直接鉴定中的应用日益广泛, 为了快速、准确地明确血流感染的病原菌, 出现了许多快速前处理结合MALDI-TOF MS鉴定阳性血培养瓶病原菌的方法, 不同的前处理方法的鉴定准确率存在一定差异, 但整体准确率较高。结论: 目前的研究显示, 不同的快速前处理结合MALDI-TOF MS在血流感染直接鉴定中具有一定的可行性, 能够很大程度缩短病原菌鉴定的时间, 具有突出的优势。

## 关键词

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱, 快速鉴定, 血流感染, 血培养

# Research Progress on Rapid Pre-Treatment Combined with MALDI-TOF MS for Direct Identification of Pathogens in Bloodstream Infections

Xiong Yan, Min Guo\*, Haishun Li

Department of Laboratory Medicine, The Fifth Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Gejiu Yunnan

Received: Nov. 13<sup>th</sup>, 2023; accepted: Dec. 22<sup>nd</sup>, 2023; published: Dec. 29<sup>th</sup>, 2023

\*通讯作者。

文章引用: 严雄, 郭民, 李海顺. 快速前处理结合 MALDI-TOF MS 在血流感染病原菌直接鉴定中的研究进展[J]. 医学诊断, 2023, 13(4): 472-477. DOI: 10.12677/md.2023.134072

## Abstract

**Objective:** To review the research progress of rapid pre-treatment combined with MALDI-TOF MS in the direct identification of pathogens in bloodstream infections. **Method:** The authors reviewed the research background and current status of rapid pre-treatment combined with MALDI-TOF MS in the direct identification of pathogens in bloodstream infections by reviewing relevant literature both domestically and internationally. **Result:** The application of MALDI-TOF MS technology in the direct identification of pathogens in bloodstream infections is becoming increasingly widespread. In order to quickly and accurately identify the pathogens of bloodstream infections, many methods combining rapid pre-treatment with MALDI-TOF MS identification of positive blood culture bottle pathogens have emerged. Different pre-treatment methods have certain differences in identification accuracy, but the overall accuracy is relatively high. **Conclusion:** Current research shows that different rapid pre-treatment methods combined with MALDI-TOF MS have certain feasibility in the direct identification of bloodstream infections, which can greatly shorten the time for pathogen identification and have outstanding advantages.

## Keywords

MALDI-TOF MS, Rapid Identification, Bloodstream Infection, Blood Culture

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

血流感染(Bloodstream Infection, BSI)是指病原体进入人体血液导致的一种严重全身感染性疾病,病原体以细菌为主。随着侵入性操作的大量开展和免疫抑制剂的广泛使用,其发生率越来越高,病死率也大幅攀升[1] [2],成为了医院最危重的感染之一[3]。血流感染在我国的死亡率为 28.7%;在欧洲的死亡率为 13.1%;在北美洲的死亡率为 13.8% [4]。在血流感染的管理中,快速使用适当的抗菌药物是非常重要的,任何延误都可能导致死亡率大幅增加[5]。

血液培养(Blood Culture, 简称血培养)是诊断血流感染的金标准[6],也是判断血流感染病情的重要手段[7],在怀疑血流感染的情况下,都建议进行血培养以明确病原菌[8],对血流感染具有十分重要的意义[9]。血流感染患者抗菌治疗的延迟与患者不良反应的增加甚至死亡密切相关[10]。血流感染的病原菌的分布情况复杂[11],目前常规血流感染的病原菌鉴定所需时间往往较长,如何快速、准确、有效地进行血培养病原菌检测对血流感染的诊断和治疗具有非常重要的意义[12] [13]。

## 2. 背景

血流感染病情往往进展迅速、凶险。国外有文献报道[14] [15],从出现症状到使用适当抗菌药物之间的时间长短与死亡率直接相关,血流感染患者接受有效的抗菌药物治疗每延迟 1 小时,平均存活率将下降约 7.6%。如何快速、准确地明确病原菌并采取针对性抗菌治疗尤为重要[16]。众多国内外的微生物从业人员及学者不断探索,希望从耗时较长的阳性血培养标本细菌的转种纯化环节寻找突破口,尽可能缩短病原菌的鉴定时长。

### 3. MALDI-TOF MS 技术在血流感染病原菌鉴定中的应用

质谱仪(Mass Spectrometry)采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOFMS)技术鉴别不同质量蛋白并获得微生物蛋白质质量指纹图,在蛋白质质量指纹图数据库中对比最终得到结果。常用于临床分离的细菌(含厌氧菌、苛养菌、分枝杆菌、诺卡菌)及真菌等的快速鉴定。MALDI-TOF MS 病原微生物鉴定技术在灵敏性、准确性、操作简便性等方面,相较于传统生化鉴定技术都是更优的选择,已逐渐被广泛采用,在细菌鉴定工作中发挥着越来越重要的作用。

#### 3.1. 常规质谱鉴定法

与传统生化鉴定技术相比, MALDI-TOF MS 技术是一种功能强大、快速、精确且经济高效的鉴定完整细菌的方法[17]。MALDI-TOF MS 技术的常规细菌鉴定流程与常规生化鉴定大致相同:1) 自动培养与检测,若血液中有菌生长,报警提示阳性;2) 将阳性血培养液转种至平板并培养过夜以获得足够量的单个菌落(必要时需转种纯化);3) 上机鉴定并得到病原菌鉴定结果。在医院进行常规的细菌物种鉴定至少需要 24 小时[18] [19]。相较于传统生化鉴定技术,在常见病原菌的鉴定中 MALDI-TOF MS 技术的准确率更好,仪器运行鉴定所需时间较短,但鉴定总时长仅仅稍有缩短。随着血流感染诊疗水平不断提升,常规血培养病原菌的鉴定流程所需时长逐渐不能满足血流感染快速诊疗的要求。

#### 3.2. 快速前处理结合 MALDI-TOFMS 技术在血流感染病原菌直接鉴定中的探索

血培养阳性标本细菌快速富集化结合 MALDI-TOF MS 技术直接鉴定血培养阳性标本病原菌(质谱直接鉴定法)是当血培养瓶阳性报警后即对本标本进行快速细菌富集处理,然后直接运用 MALDI-TOF MS 技术进行细菌鉴定的方法。此方法得益于 MALDI-TOF MS 技术对前处理的包容性更大,只需要获得一定量和纯度的细菌蛋白便可用于鉴定,同时阳性血培养瓶内多为单一菌生长,较纯的细菌蛋白易于获取,此方法相比于需先将阳性血培养标本转种培养出纯化的菌落才能进一步完成鉴定的常规鉴定方法的报告时长缩短了约 24 小时。

目前研究较多细菌分离和纯化的前处理方法主要有分离胶分离法、短时培养法和选择性裂解法等[20] [21]。

##### 3.2.1. 分离胶分离法结合 MALDI-TOF MS 技术在阳性血培养细菌鉴定中的应用

分离胶在血培养病原菌快速鉴定中被运用于血细胞与细菌的分离,经离心、洗涤等步骤后得到细菌沉淀用于病原菌质谱鉴定。与报道的其他前处理方法相比,无需蛋白提取步骤,可在 20 min 内完成鉴定。此方法相关的研究结果提示革兰阴性杆菌的准确率高于革兰阳性球菌,少见菌的准确率明显较低,可能与两者蛋白提取差异及质谱仪相应菌株库差异等有关[22]。分离胶分离法[23]操作简便、成本低廉,且鉴定时长得到非常显著的缩短,被临床实验室广泛关注。

##### 3.2.2. 短时培养法结合 MALDI-TOF MS 技术在阳性血培养细菌鉴定中的应用

将阳性血培养液经短时增菌培养后用所得菌膜进行病原菌鉴定[24],其准确性和可行性也在逐渐被证实,一项短时培养法结合 MALDI-TOF MS 技术在阳性血培养细菌鉴定的研究中[25]鉴定了 310 个阳性血标本,95.2%得出鉴定结果,结果中 97.9%正确鉴定到种,且革兰阳性菌和革兰阴性菌的准确率也存在与分离胶分离法类似的差异;更有学者经对比后得出,短时培养法结合 MALDI-TOF MS 技术进行血培养病原菌的鉴定,随着培养时间的延长,其鉴定成功率随之增加[26] [27] [28]。

短时培养结合质谱鉴定技术在血流感染直接鉴定中的准确率较高;与传统培养法相比,鉴定时长有一定程度缩短;对于部分病原菌生长缓慢,因分离胶分离法达不到质谱检测限致准确率较低的,有学者

认为通过短时液相培养结合分离胶分离法进行鉴定前处理可使此类细菌的直接鉴定得到改善。

### 3.2.3. 选择性裂解法结合 MALDI-TOF MS 技术在阳性血培养细菌鉴定中的应用

常见的选择性裂解法包括去污剂选择性裂解法和渗透压选择性裂解法。

选择性裂解法是利用去污剂(即表面活性剂)可用于破坏细胞膜,裂解细胞并释放其内容物,可用于破坏血细胞,纯化从阳性血培养瓶中富集的细菌,降低对质谱鉴定的干扰的原理提取纯化蛋白。Sepsitype 试剂盒法是德国布鲁克商品化的去污剂选择性裂解血细胞集菌产品,操作简单,但成本较高[18]。目前实验常用的去污剂有十二烷基硫酸钠(Sodium Dodecyl Sulfate, SDS)和皂苷,在阳性血培养的直接鉴定中,用分离胶促凝管法富集菌体后增加 SDS 的洗涤处理,对增加 MALDI-TOF MS 的鉴定准确率有较大帮助,并且 SDS 前处理法结合质谱鉴定技术的鉴定效果革兰阴性菌好于革兰阳性菌[29];使用皂苷方法[18]在革兰阴性杆菌和革兰阳性球菌的鉴定率分别为 94%、70%。

渗透压选择性裂解法结合质谱直接鉴定血培养阳性标本的相关研究[30]中,总的鉴定准确率较高,革兰阳性杆菌鉴定种水平的准确率也显著低于革兰阴性杆菌和革兰阳性球菌,此方法的研究相对较少。

## 4. 总结

目前国外已有用于血培养阳性标本前处理的商品试剂盒,但由于试剂盒成本高等原因,国内实验室多采用物理分离或结合自制试剂用于血液标本的处理[31]。不同的快速前处理结合 MALDI-TOF MS 技术在血流感染直接鉴定中具有一定的可行性,能够很大程度缩短病原菌鉴定的时间。前处理方法多样化,从以上几种快速前处理方法结合 MALDI-TOF MS 直接鉴定与常规质谱鉴定的对比结果可以看出,革兰阳性球菌的鉴定率都相对较低,原因可能是[18]: 1) 革兰阳性球菌较厚的细胞壁影响了蛋白提取; 2) 与所需的革兰阴性菌的数量相比,快速鉴定的分析可能需要更多的革兰阳性菌; 3) 一些革兰阳性球菌的蛋白质结构高度相似容易被错误鉴定。另外,生长缓慢且需要很长时间才能充分增殖的细菌易被错误鉴定,可能是由于核糖体蛋白在对数期大量表达,新鲜的增殖细菌最适合通过 MALDI-TOF MS 进行鉴定。但各方法结果的可靠性尚未被完全证实,且国内尚未形成规范,有待进一步探索。

## 参考文献

- [1] Liu, Y., Cui, B., Pi, C., *et al.* (2021) Analysis of Prognostic Risk Factors of Bloodstream Infections in Beijing Communities: A Retrospective Study from 2015 to 2019. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, **13**, e2021060. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2021.060>
- [2] Mponponsoo, K., Leal, J., Spackman, E., *et al.* (2022) Mathematical Model of the Cost-Effectiveness of the BioFire FilmArray Blood Culture Identification (BCID) Panel Molecular Rapid Diagnostic Test Compared with Conventional Methods for Identification of *Escherichia coli* Bloodstream Infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **77**, 507-516. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab398>
- [3] 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.
- [4] 杜冰钰, 赵蕊, 王欣慧, 等. 南京地区 2130 株血流感染病原菌的分布及耐药监测[J]. 中国卫生检验杂志, 2022, 32(18): 2177-2180.
- [5] Yoo, I.Y., Ha, S.I., Huh, H.J., *et al.* (2024) Evaluation of a Modified Protocol for the SepsisPrep Kit for Direct Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing from Positive Blood Culture Using BACTEC Plus and BacT/Alert Blood Culture Bottles. *Annals of Laboratory Medicine*, **44**, 183-187. <https://doi.org/10.3343/alm.2023.0294>
- [6] 陈凯妮, 庞彩莲, 吴品, 等. 血培养病原菌报阳时间、菌群分布及耐药性分析[J]. 河南医学研究, 2021, 30(32): 6097-6100.
- [7] Scheer, C.S., Fuchs, C., Gründling, M., *et al.* (2019) Impact of Antibiotic Administration on Blood Culture Positivity at the Beginning of Sepsis: A Prospective Clinical Cohort Study. *Clinical Microbiology and Infection*, **25**, 326-331. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.05.016>

- [8] Fabre, V., Sharara, S.L., Salinas, A.B., *et al.* (2020) Does This Patient Need Blood Cultures? A Scoping Review of Indications for Blood Cultures in Adult Nonneutropenic Inpatients. *Clinical Infectious Diseases*, **71**, 1339-1347. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa039>
- [9] Fida, M., Wolf, M.J., Hamdi, A., *et al.* (2021) Detection of Pathogenic Bacteria from Septic Patients Using 16S Ribosomal RNA Gene-Targeted Metagenomic Sequencing. *Clinical Infectious Diseases*, **73**, 1165-1172. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab349>
- [10] Wang, Y., Jin, Y., Bai, Y., *et al.* (2020) Rapid Method for Direct Identification of Positive Blood Cultures by MALDI-TOF MS. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **20**, Article No. 235. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9365>
- [11] Zhou, M., Wu, Y., Kudinha, T., *et al.* (2021) Comprehensive Pathogen Identification, Antibiotic Resistance, and Virulence Genes Prediction Directly from Simulated Blood Samples and Positive Blood Cultures by Nanopore Metagenomic Sequencing. *Frontiers in Genetics*, **12**, Article 620009. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.620009>
- [12] Peri, A.M., Harris, P.N.A. and Paterson, D.L. (2022) Culture-Independent Detection Systems for Bloodstream Infection. *Clinical Microbiology and Infection*, **28**, 195-201. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.09.039>
- [13] Eichenberger, E.M., de Vries, C.R., Ruffin, F., *et al.* (2022) Microbial Cell-Free DNA Identifies Etiology of Bloodstream Infections, Persists Longer than Conventional Blood Cultures, and Its Duration of Detection Is Associated with Metastatic Infection in Patients with *Staphylococcus aureus* and Gram-Negative Bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, **74**, 2020-2027. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab742>
- [14] Buehler, S.S., Madison, B., Snyder, S.R., *et al.* (2016) Effectiveness of Practices to Increase Timeliness of Providing Targeted Therapy for Inpatients with Bloodstream Infections: A Laboratory Medicine Best Practices Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Microbiology Reviews*, **29**, 59-103. <https://doi.org/10.1128/CMR.00053-14>
- [15] Rydzak, T., Groves, R.A., Zhang, R., *et al.* (2022) Metabolic Preference Assay for Rapid Diagnosis of Bloodstream Infections. *Nature Communications*, **13**, Article No. 2332. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30048-6>
- [16] 李爽, 杜延召, 周超, 等. 2051 株血流感染病原菌分布及耐药分析[J]. 中国老年保健医学, 2021, 19(5): 99-104.
- [17] 吴富炜, 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.
- [18] Bianco, G., Comini, S., Boattini, M., *et al.* (2022) MALDI-TOF MS-Based Approaches for Direct Identification of Gram-Negative Bacteria and Bla KPC-Carrying Plasmid Detection from Blood Cultures: A Three-Year Single-Centre Study and Proposal of a Diagnostic Algorithm. *Microorganisms*, **11**, Article 91. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010091>
- [19] Kim, K.J., Yun, S.G., Cho, Y., *et al.* (2023) Evaluation of a Sterile, Filter-Based, In-House Method for Rapid Direct Bacterial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing Using Positive Blood Culture. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **42**, 691-700. <https://doi.org/10.1007/s10096-023-04592-y>
- [20] Ponderand, L., Pavese, P., Maubon, D., Giraudon, E., *et al.* (2020) Evaluation of Rapid Sepsityper<sup>®</sup> Protocol and Specific MBT-Sepsityper Module (Bruker Daltonics) for the Rapid Diagnosis of Bacteremia and Fungemia by MALDI-TOF MS. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **19**, Article No. 60. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00403-w>
- [21] Azrad, M., Keness, Y., Nitzan, O., *et al.* (2019) Cheap and Rapid In-House Method for Direct Identification of Positive Blood Cultures by MALDI-TOF MS Technology. *BMC Infectious Diseases*, **19**, Article No. 72. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3709-9>
- [22] 许雨乔, 文怡, 张晓慧, 等. 质谱直接鉴定血培养阳性菌的前处理方法评估[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2022, 42(2): 233-238.
- [23] 胡继红, 马筱玲, 王辉, 等. MALDI-TOF MS 在临床微生物鉴定中的标准化操作专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(4): 241-249.
- [24] 马立艳, 孙伟, 苏建荣. MALDI-TOF MS 结合短时培养法在阳性血培养病原菌鉴定中的临床应用[J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(2): 223-225.
- [25] Zengin Canalp, H. and Bayraktar, B. (2021) Direct Rapid Identification from Positive Blood Cultures by MALDI-TOF MS: Specific Focus on Turnaround Times. *Microbiology Spectrum*, **9**, e01103-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01103-21>
- [26] Özenci, V., *et al.* (2020) The Impact of Delayed Analysis of Positive Blood Cultures on the Performance of Short-Term Culture Followed by MALDI-TOF MS. *Journal of Microbiological Methods*, **177**, Article ID: 106027. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106027>
- [27] Cherkaoui, A., Renzi, G., Azam, N., *et al.* (2020) Rapid Identification by MALDI-TOF MS and Antimicrobial Disk Diffusion Susceptibility Testing for Positive Blood Cultures after a Short Incubation on the WASPLab. *European Journal*

- 
- of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **39**, 1063-1070. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03817-8>
- [28] Bellanger, P., Gbaguidi-Haore, H., Liapis, E., *et al.* (2019) Rapid Identification of *Candida* sp. by MALDI-TOF Mass Spectrometry Subsequent to Short-Term Incubation on a Solid Medium. *APMIS*, **127**, 217-221. <https://doi.org/10.1111/apm.12936>
- [29] 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.
- [30] 张丽娜, 陈莎, 杨柳, 等. 渗透压选择性裂解法在 MALDI-TOF MS 直接鉴定血培养阳性标本中的应用[J]. 临床检验杂志, 2020, 38(11): 858-860, 866.
- [31] Chen, X.F., Hou, X., Xiao, M., *et al.* (2021) Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Analysis for the Identification of Pathogenic Microorganisms: A Review. *Microorganisms*, **9**, Article 1536. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071536>