

中国临床微生物质谱应用专家共识

中国临床微生物质谱共识专家组

1 前言

临床微生物检验在感染性疾病诊断、用药指导、医院感染控制、抗菌药物管理等多方面均扮演着不可或缺的重要角色。但是该领域仍然面临着样本流转时间 (turn around time, 简称 TAT) 长等重大问题。例如, 在微生物鉴定方面, 虽然目前也有自动化鉴定仪出现, 相对缩短了 TAT, 但均大多基于微生物生物化学反应原理, 仍然不能实现快速鉴定。因此, 临床微生物实验室亟需新的检验技术替代现有技术, 实现新的突破。

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, 简称 MALDI-TOF MS) 技术, 是 20 世纪 80 年代末问世并迅速发展起来的一种质谱分析技术。它使得传统的主要用于小分子物质研究的质谱技术发生了革命性变革, 不仅迎来了技术发展的新时代, 而且也给医学、生物领域, 尤其是临床微生物检验领域带来了革命。但是, MALDI-TOF MS 技术在临床微生物菌种鉴定领域的应用, 除了技术本身, 更重要的是依赖于质谱菌种鉴定数据库。因此, 数据库中图谱的质量、数量都将直接影响鉴定的成功率与准确率。由于病原微生物分布流行情况不同, 实验室在原有数据库基础上可补充建立本地病原微生物的质谱指纹图谱库, 提高鉴定成功率。

对于临床实验室来讲, MALDI-TOF MS 作为一项新兴技术, 在使用方面仍然存在一些困惑。实验室人员必须掌握

相关的知识, 例如影响因素、校准、质量控制、仪器保养维护、本地指纹图谱库的质量保证等, 才能保证结果的准确性和可靠性。本共识的制定, 将进一步规范 MALDI-TOF MS 技术在临床微生物实验室的应用, 提高临床微生物诊断能力, 缩短 TAT, 最终实现临床受益。

2 MALDI-TOF MS 的基本原理、操作及维护

2.1 MALDI-TOF MS 简介及工作原理

2.1.1 MALDI-TOF MS 简介 质谱分析技术的基本原理是使样品分子离子化, 具有不同质荷比 (m/z) 的离子经质量分析器通过测定得到该样品的分子量。20 世纪 80 年代以前, 质谱主要应用于化学领域, 主要原因是生物大分子热不稳定、极性很强, 很难实现离子化。80 年代后期, 科学家们开始探索适用于生物大分子的软电离源。电喷雾电离质谱 (electrospray ionization mass spectrometry, ESI MS) 和 MALDI-TOF MS 的突破性进展, 极大地提高了质谱在分析生物大分子中的能力, 生物质谱技术伴随着质谱软电离方法的产生和完善迅速发展起来, 其中以 MALDI-TOF MS 技术发展最为迅速, 应用最为广泛, 已经在蛋白质组学、遗传学、微生物学和药学等多个领域广泛应用。

2.1.2 MALDI-TOF MS 基本原理 根据样品的电离方式、检测器的种类不同, 质谱分析方法种类众多、原理各异。但是, 不论任何类型的质谱均包括样品的离子化和质量分离的基本功能单元。MALDI-TOF MS 的工作原理见图 1。

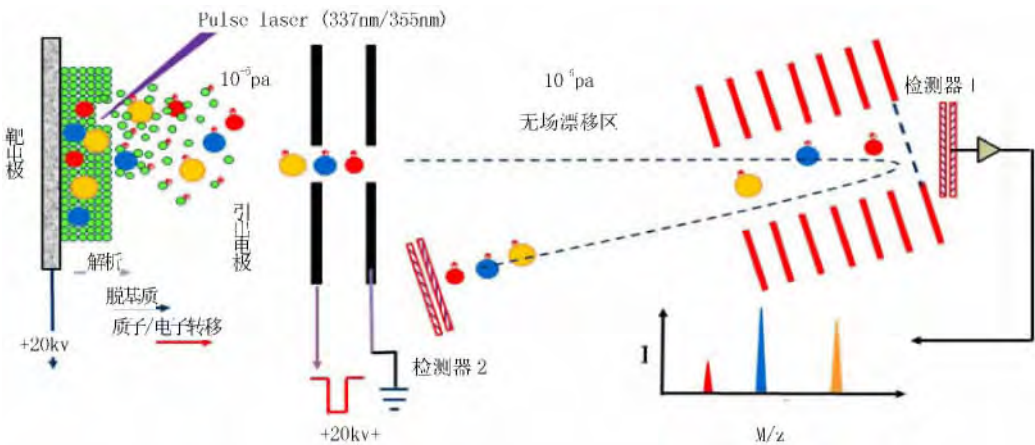


图 1 MALDI-TOF MS 的工作原理图(正离子检测模式)
Figure1 Operating principle of MALDI-TOF MS (positive ion detection mode)

2.1.2.1 MALDI 离子化 MALDI 离子化的原理是将微量 样品与过量小分子基质混合, 加到样品盘上, 溶剂挥发后样

品与基质形成共结晶,在脉冲激光的作用下,基质吸收激光的能量并传递到样品分子,使样品实现电离和气化。电离可以是基质的质子转移到样品分子,也可以是样品分子的质子转移到基质分子上,通常前者较为常见。

基质是 MALDI 离子化过程的能量传递载体,它能增强样品对激光的吸收能力,并通过吸收大部分的激光能量降低激光对样品造成的破坏。基质通常为有机芳香弱酸,能强烈吸收激光能量,具有较高的水溶性、挥发性和化学惰性。常用的基质有烟酸、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA)、芥子酸(sinapinic acid, SA)、2,5-二羟基苯甲酸(2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB)、3-羟基吡啶甲酸(3-hydroxy-picolinic acid, 3-HPA)等。基质与样品的摩尔比在 1:1000~1:10000 易于干燥和形成结晶,有利于样品的离子化。不同的待测样品要选择不同的基质,通常蛋白质样品采用 CHCA 或 SA。

2.1.2.2 TOF 质量分析器 MALDI 离子源最常用的分析器是飞行时间分析器(time of flight analyzer, TOF)。TOF 质量分析器使用脉冲电场,使在 MALDI 离子源内产生的离子加速并以恒定的速度飞向离子检测器。根据离子在飞行管内的飞行速度与 m/z 平方根成正比,不同 m/z 值的样品离子到达检测器的时间不同,从而实现对不同 m/z 值的样品分子的鉴定。多数 MALDI-TOF MS 都采用阳离子检测方式,因为阴离子检测效率相对较低,只有 DNA 和其他酸性化合物采用阴离子检测更有效。质谱仪需要在真空情况下运转,为样品离子在质量分析器内的自由飞行提供环境条件,以提高测量精度和保护检测器。

MALDI-TOF MS 的特点是可检测分子量范围大、检测效率高、高通量操作,对样品纯度要求不高,能耐受盐、去垢剂等,适用于细菌、动物细胞等复杂样品的分析。线性飞行时间质谱主要缺点是分辨率较低,因为离子在离开离子源时的初始能量不同,相同 m/z 的离子到达检测器的时间有一定分布造成分辨率低。通过 DE 技术(delay extraction),可以将线性模式的分辨率提高数倍。另一种提高分辨率的方式是采用反射模式:在线性检测器前加静电场反射装置,将飞行的离子反推回去,初始能量大的离子由于速度快,进入静电场的距离长,返回的路程也长,而初始能量小的离子进入静电场的距离短,返回的路程也短,这样就会在一定位置聚焦,实现改善仪器分辨率的目的。但是对于微生物大分子(2~20 kDa)鉴定时,主要采用线性模式。

MALDI-TOF MS 鉴定微生物的主要原理是利用已知菌种建立数据库,通过检测获得微生物的蛋白质图谱,由于不同菌种核糖体蛋白(2~20 kDa)大小有差异,将所得的谱图与数据库中的微生物参考图谱比对后可以得到鉴定结果。

2.2 MALDI-TOF MS 主要性能指标

2.2.1 质量分辨率 飞行时间质谱仪通常采用半峰高宽质量分辨率(full width at half maximum)。分辨率= m/m (m 是指谱峰高度最大处一半时的宽度)。对于微生物鉴定系统,目前质谱仪的质量分辨率约为 1 k。分辨率对最后的鉴定准确率不是最关键指标,但是更高的分辨率能够使谱图更

精细,带来更多的谱图信息量,这对提高检索准确率是有利的。

2.2.2 质量检测范围 飞行时间质谱仪理论上没有质量检测上限,但实际上会受到离子探测器、离子动能和信号记录系统的限制。MALDI-TOF MS 可以检测到质量数十万 Da 的大分子,是目前所有质谱中最高的。对于微生物鉴定而言,核糖体蛋白分子的质量主要集中在 2~20 kDa,所以仪器的质量检测上限为 30 kDa 就能满足鉴定需要。

2.2.3 灵敏度 MALDI-TOF MS 仪器自身的灵敏度通常采用标准样品(BSA 或 insulin 等)进行测试。线性模式灵敏度一般为 fmol 级。但是,实际微生物检测时的灵敏度除了受到仪器本身的限制,还与基质类型、病原种类、样品处理和样品靶表面性质等诸多因素有关。

2.2.4 质量检测精度与重复性 MALDI-TOF MS 质量检测精度与重复性主要依赖于仪器设计,以及电学系统的精度和稳定性,一般为数百 ppm。质量检测精度与重复性是影响微生物鉴定率的关键指标。

2.2.5 鉴定准确率 毋庸置疑,仪器的微生物鉴定准确率是所有性能指标中最重要的指标。它不仅取决于前面介绍的 4 个硬件指标,检索算法和数据库等软件系统也是至关重要的。另外,在实际应用时,由于病原种类和样品前处理等因素也会影响最终的鉴定准确率。

2.3 MALDI-TOF 质谱仪的操作及维护

2.3.1 质量校准 质量校准通常采用标准样品对仪器进行标定校准,例如利用大肠埃希菌 ATCC 8739 的特征峰或采用标准蛋白质试剂进行校准。

2.3.2 质控(标准菌株) 质控的目的是评价和监测仪器是否处于正常的鉴定工作状态。如使用产气肠杆菌 ATCC 13048 和光滑念珠菌 ATCC MYA-2950 进行质控。阴性对照只加基质,无鉴定结果。如果阴性对照出现鉴定结果,需清洗或更换靶板。

2.3.3 维护

2.3.3.1 激光器 最常用的激光是 Nd:YAG(脉冲固体紫外激光)和 N₂ 激光器,目前以 N₂ 激光器居多。激光光源是有使用寿命的,一般激光发射次数 $>6 \times 10^7$ 次。因此,使用过程中需尽可能减少激光发射次数,延长使用时间。样本前处理程序及点靶过程的标准化有助于减少不必要的重复打靶次数。

2.3.3.2 真空系统 仪器的真空系统是保障仪器正常工作的必备设备。质谱仪的真空度必须 $<5 \times 10^{-6}$ mbar 才能工作。仪器的真空系统主要包括真空获得(真空泵:分子泵及前级泵)和真空测量两个部分。真空系统的正确维护能延长其寿命,降低仪器使用成本。比如:减少仪器重启次数、靶点尽量干燥后再进靶、尽可能缩短换靶时间和经常检测真空泵状态等操作都是对真空系统有益处的。

2.3.3.3 靶板 靶板分为永久性和一次性两种。永久性靶板通常为不锈钢材料,表面经过疏水处理。建议靶板清洗方法:先用无尘布沾取丙酮将靶面样品擦拭干净,再置于甲醇(污染严重时采用甲醇/10%乙酸 1:1 (v/v))中常温超声

10~15 min(间歇超声:超声 5 min、冷却 5 min,以防靶板过热),最后用去离子水冲洗,洁净无尘布擦去表面水滴,置于真空干燥箱中保存。使用后尽快对靶板进行清洗,以免靶板被腐蚀。

2.3.3.4 其他辅助器件 其他辅助器件的维护包括冷却风扇入口过滤棉、前级真空泵的入口干燥剂和排放吸附剂的定期更换等。

2.4 MALDI-TOF MS 用于培养分离微生物的鉴定

2.4.1 常见细菌的鉴定 常规微生物鉴定主要基于生化反应、显微镜检、免疫学或者分子生物学。这些分析方法专业知识要求较高,并且费时费力。等待结果期间临床医师会经验性使用抗菌药物,然而有时是不合适或者错误的。现代临床微生物实验室需要快速、可靠和经济的方法来鉴定细菌,以便及早进行适当的抗菌药物治疗。质谱技术将微生物鉴定从 24~48 h 缩短到数分钟,而且仅需分析极少的菌量($10^4 \sim 10^6$ CFU/ml)^[1]。以 16S rRNA 基因测序结果为标准,质谱仪正确鉴定率为 90.0%~95.0%,远高于以往的商业自动化鉴定系统^[2]。

目前采用不同处理方法分析不同微生物种类,有些细菌能直接被质谱仪识别,称为直接细胞分析或直接涂布法,而另一类则使用全细胞裂解物或细胞粗提取物^[3]。不同的细菌应严格按照操作说明书进行样品制备。直接细胞分析时,取单个菌落涂在靶板上,并立即滴加基质液即可。革兰阴性菌如肠杆菌属、奈瑟菌属^[4]、耶尔森菌属^[5]和弧菌属^[6],可以通过直接细胞分析进行鉴定。革兰阳性菌一般可以进行直接细胞分析,而部分革兰阳性菌如果破细胞壁不理想则可能影响核糖体蛋白分析,使用甲酸萃取法进行蛋白提取可以提高质谱仪的鉴定能力^[7]。此外,甲酸提取蛋白步骤也适用于黏液性菌落、非发酵细菌^[8]及葡萄球菌属^[9]。部分菌株无法被鉴定是因为这些菌株不包含在数据库,并非质谱仪方法学错误。质谱仪分析的是核糖体蛋白,然而一些细菌核糖体蛋白差异较小,如志贺氏菌属与大肠埃希菌、部分嗜麦芽寡养单胞菌与痤疮丙酸杆菌、肺炎链球菌与口腔/缓症链球菌,这可能导致错误鉴定^[1]。

2.4.2 酵母菌的鉴定 目前,由于数据库中已经包含大量的临床酵母菌参考谱图,使其可以用于常规鉴定酵母菌。已经有很多的研究对 MALDI-TOF MS 用于酵母菌鉴定的能力进行了评估,发现其鉴定酵母菌的性能很好。酵母菌的鉴定可以使用直接涂布法或甲酸萃取法。部分数据库无法分辨亲缘关系较近的菌种复合体,如近平滑念珠菌复合体、新型隐球菌复合体等^[10]。结合本实验室或者当地的流行病学资料,若是分离率<1%的菌种,建议进行复核鉴定^[11]。当出现不可靠鉴定结果或无鉴定结果,考虑菌株放置时间是否过长、菌量过少或过多导致结晶体形成不良、菌株库是否未覆盖该菌种等。少见菌种可以使用核酸测序等方法辅助鉴定。

2.4.3 其他难以培养或需特殊前处理的菌种

2.4.3.1 丝状真菌 丝状真菌由于所需培养时间长、传统鉴定方法具有局限性,使用 MALDI-TOF MS 进行丝状真菌

鉴定更能体现该方法的快速和准确的优势。但是,丝状真菌由于细胞壁难以破碎,直接涂布法通常不能得到好的鉴定结果,鉴定前需要特殊的前处理方式。使用旋转培养法进行菌株的液体培养、使用乙醇/甲酸提取法等改良方法进行前处理可以明显改善鉴定结果^[12-16]。

2.4.3.2 分枝杆菌 致病分枝杆菌的慢生长(6周~5个月),使其分离及鉴定难以满足临床需要。随着分枝杆菌种类的增加和机会感染率的增长,急需快速的鉴定方法。MALDI-TOF MS 提供了这种选择。MALDI-TOF MS 鉴定分枝杆菌的效果受标本前处理的影响,包括生长条件、细胞活性、蛋白提取程序等。多项研究提供了针对分枝杆菌的改良蛋白提取程序^[17-19]。

2.4.3.3 厌氧菌 目前,MALDI-TOF MS 已能实现对临床常见厌氧菌及许多少见厌氧菌菌种的准确鉴定,并且结果优于传统生化试验方法^[20]。一些生化反应相似,不易区分的厌氧菌也可以通过质谱技术进行区分^[21]。但对于部分菌种,如梭状芽孢杆菌,培养基的种类对鉴定效果影响不明显,但是培养时间却有明显影响,如果培养时间较长,芽孢形成,质谱鉴定能力的准确性就会下降^[22-24]。厌氧菌的前处理方法与普通细菌相同,可以使用直接涂布法和乙醇/甲酸提取法。由于多数厌氧菌生长速度较需氧菌慢,应适当延长培养时间。

2.4.3.4 奴卡菌 对于奴卡菌,标准的乙醇/甲酸提取方法效果不佳。为此,需要使用额外的前处理手段,如酸洗玻璃珠机械破碎细胞壁的方法进行菌体蛋白的提取^[25-26]。另外,部分质谱的奴卡菌指纹图谱库存在一定缺陷。实验室进行奴卡菌指纹图谱库的自建可以有效改善菌种鉴定结果^[27]。

2.4.3.5 巴尔通体 巴尔通体是慢生长(需要 7 d~6 周)的细胞内革兰阴性球菌或杆菌,并且到目前为止无可靠的生物化学鉴定方法。已有研究报道,使用 MALDI-TOF MS 成功鉴定巴尔通体,并具有较高的准确率(种水平>92.3%),此外每个亚种均发现有特异峰^[28]。

2.4.3.6 贝纳柯克斯体 贝纳柯克斯体是引起 Q 热的细胞内病原菌,具有高度的传染性,以往诊断主要依靠基于核酸的分子检测技术。有研究报道,MALDI-TOF MS 也可用于该种病原的鉴定中,但检测算法及质量范围与细菌、真菌的鉴定方法有所差异^[29]。

2.5 影响鉴定结果的主要因素

2.5.1 检测前因素

2.5.1.1 培养基的影响 对于 MALDI-TOF MS 微生物鉴定系统来说,不同培养基培养导致菌株肽质量谱有所变化^[30]。某些菌种的肽质量谱对不同成分的培养基较为敏感,肽质量谱会有较大差异,尤其是采用直接涂抹法,会影响鉴定率^[31]。大多数的菌种对不同成分的培养基产生肽质量表达谱变化没有特异性,不影响菌种的鉴定^[32-33]。培养基对鉴定结果的影响,主要在于菌体蛋白样本制备过程中是否混杂有培养基的成分(主要为盐离子),导致离子抑制,降低了检测灵敏度,样本谱图采集困难(激光强度需提高,谱图叠加数量增加)、信号噪音大、峰数目少,难于鉴定^[34-35]。因此,培

培养基的物理性质,即固体、半固体、液体是微生物质谱鉴定所需要关注的。不同物理形态的培养基培养后,菌株的前处理方式不同。固体表面培养的菌株,按乙醇/甲酸法制备样本即可;液体及半固体培养基培养的微生物,洗涤菌体是有效降低培养基成分影响的有效途径。洗涤不充分,培养基残留成分会影响质谱峰图;多次洗涤尽管可以去除杂质,但费时、影响检测效率。洗涤一次后离心处理,即可获得理想的肽指纹图谱。因此,液体、半固体培养的微生物,采用 PBS 洗涤一次后预提取蛋白,即可完全可以达到质谱检测的要求^[34]。

2.5.1.2 培养环境 因生长速度不同,菌株培养时间的选择应根据培养经验,选择菌株菌落生长最为茂盛时,比如分枝杆菌 3 d^[36]、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌为 1 d,室温存储或微需氧培养时间过长,严重影响鉴定结果;4℃条件,存放 8 d 不影响菌株识别^[37]。每次培养都保持一定的 pH 值及固定的生长率是很难实现的,不同 PH 值的培养基会影响菌株的生长速率、影响菌株的细胞形态,但对于种、属鉴定的肽质量谱,即用于菌株识别的高丰度蛋白无影响^[38]。不同的培养温度(26℃~37℃)会影响菌株的表型特征,高温范围 32、37℃的肽质量谱非常相似,不影响鉴定;低温范围 26℃,肽质量谱会有较大差异^[38]。建议待鉴定菌株的培养温度与建库菌株的培养温度保持一致。

2.5.2 检测中的因素

2.5.2.1 样本制备 MALDI-TOF MS 质谱鉴定样本的基本前期处理有两种方式,直接涂布法与预提取法。预提取法根据不同的菌种类型有不同的处理方式,如:(1)适用于大部分微生物的乙醇/甲酸提取法:取适量(5~10 mg)样品,加入 300 μl 水,仔细混匀,再加入 900 μl 无水乙醇、混匀;高速(10 000~16 000 r/min)离心 2 min,弃去上清;加入 50 μl 70%甲酸,混匀,再加入 50 μl 乙腈,混匀,高速离心 2 min,吸出上清备用。(2)适用于灭活含孢子体微生物的 80%三氟乙酸(trifluoroacetic acid,简称 TFA)提取法:取适量(5~10 mg)样品,加入 50 μl 80% TFA,反复吹打至样品完全溶解或变性,放置 10~30 min,加入 150 μl 水和 200 μl 乙腈,混匀,高速离心 2 min,吸出上清备用。(3)适用于灭活不含孢子体的微生物的 50%乙腈/2.5%TFA 提取法取适量(5~10 mg)样品,加入 100 μl 水,仔细混匀,再加入 100 μl 5% TFA/乙腈,仔细混匀,高速离心 2 min,吸出上清备用。(4)适用于酵母和厚壁微生物的海沙/丙酮-乙醇/甲酸提取法:取适量(5~10 mg)样品至研钵中,加入适量海沙和 500 μl 丙酮,仔细研磨至丙酮完全挥发。加入 500~700 μl 20% 甲酸,短时匀浆;吸出 300 μl 溶液,加入 900 μl 无水乙醇,仔细混匀,高速离心 2 min,弃去上清;加入 50 μl 70%甲酸,仔细混匀,再加入 50 μl 乙腈,仔细混匀,高速离心 2 min,吸出上清备用。目前,直接涂抹法及预提取法均有使用。样品的处理方法对基质和样品的结晶状态影响很大。对于直接菌落涂抹法,操作较为简便。但无论是基质直接覆盖菌落还是与菌落混合,所产生的结晶成斑点状、不均一,重复性较差;谱图峰数量较少,并且样本量对谱图质量有显著的影响;对于操作者来说,菌量的控制很难均一,导致谱图的重复性

不理想。预提取法样品与基质的结晶均一,具有很好的重复性;肽质量谱具有很好的重复性,峰数目及质量均好于直接涂抹法^[34,39]。

此外从生物安全角度来说,直接涂抹法为活菌检测,易造成环境及人员污染,存在安全性风险;预提取方法处理后,普通细菌及带荚膜的细菌可被灭活,带芽胞的细菌乙醇/甲酸法处理后,适宜的条件下可正常生长,80% TFA 法处理后可完全灭活。

2.5.2.2 标本直接检测中样本量的影响 MALDI-TOF MS 技术对置于靶板上的细菌的最低检测限约为 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ CFU/ml。直接检测阳性血培养瓶的细菌浓度需要 1×10^7 CFU/ml^[40-41],直接检测中段尿样本中病原菌至少需要的细菌数量是 1×10^5 CFU/ml^[42]。若直接检测血液以及中段尿等临床样本中的病原菌,首先必须富集细菌。细菌量 1×10^5 CFU/ml 的尿液样本进行直接的 MALDI-TOF MS 鉴定,尿液样本经过差速离心法处理后,有 87.5%~92.0% 的敏感性^[43-44]。多数情况下细菌数 $\geq 1 \times 10^5$ CFU/ml 的样本能产生更高的鉴定分数,而随着样本中细菌数的降低,鉴定成功的比例和鉴定分数也在下降,当菌落数 $< 1 \times 10^4$ CFU/ml 时,不能得到可靠的鉴定结果^[45]。

2.5.2.3 样品稳定性、样品保存 预提取方法制备的蛋白样本,可于 4℃保存 1 周,-20℃保存 1 个月,-80℃保存 3 个月;样本真空冻干后-20℃或-80℃保存 1 年,可正常使用。点样、与基质结合的样本点,根据不同的前处理方法及菌种的差异,可保存 2 d~1 周。部分特殊样本需在点样后 2 h 内完成检测。

2.5.2.4 手动及自动蛋白谱图获取 MALDI-TOF MS 系统具备手动及自动采样两种采样方式。自动采样是在调整好的一致性的参数下进行谱图数据采集,速度快、自动化、无需人员看守;对于不同的样本点,蛋白量不一致、结晶状态不一致,而自动采样采用一致的采集路径,统一的激光强度、固定的谱图叠加次数,对于质量差的样本点会有不理想的谱图,导致某些点鉴定不出或得分较低。手动谱图采集,可随时调整参数,便于在整个点样点范围内采集到理想的数据。针对临床使用,建议对于大批量的数据首先采用自动采样程序进行采集,没有鉴定或得分较低的样本点,采用手动模式进行数据补采。

2.5.2.5 结果判定标准 目前商业化的微生物质谱识别系统都有各自的属、种判读标准,具体可参见各系统的操作说明。值得注意的是,为避免假阳性,一般商业质谱的判定标准较为严格,使用者可根据自己的数据库系统,在使用经验积累及科研评估的基础上,根据不同菌种特性调整判定值^[46]。

2.5.2.6 混合感染样本 对于 MALDI-TOF MS 微生物检测系统,混合样本的检测是难题。混合菌蛋白丰度、肽质量谱差异性以及特异性均会影响鉴定结果,可能会检测出 ≥ 2 种菌种,也可能只能检测出优势菌,或得到无法鉴定的结果。

(下转第 11 期)