

阳性血培养标本菌种快速鉴定及药敏试验方法研究

范芳华¹, 王选¹, 张亚培¹, 肖震¹, 周瑛², 董世雷¹

1. 浙江医院医学检验科微生物室, 浙江 杭州 310013; 2. 浙江医院, 浙江 杭州 310013

摘要: **目的** 建立能快速实现阳性血培养标本菌种鉴定和药敏试验的方法, 为及时诊断和治疗血流感染患者提供参考。**方法** 收集2022年2—5月浙江医院住院患者血培养标本1 154份, 通过改良分离胶分离法富集纯化菌体, 采用VITEK MS质谱仪和VITEK2 Compact全自动微生物系统进行菌种鉴定和药敏试验。以传统VITEK2 Compact检测法(传统法)为标准, 检验菌种鉴定和药敏试验结果的准确率。**结果** 1 154份血培养标本经传统法鉴定阳性174份, 阴性980份。对174份阳性标本采用本方法进行菌种鉴定, 165份与传统法鉴定结果一致, 鉴定准确率为94.83%, 其中革兰阴性菌准确率为99.21%, 革兰阳性菌准确率为82.22%。对本方法与传统法鉴定结果相符的158株菌进行药敏试验, 准确率为90.17%, 其中革兰阴性菌准确率为90.27%, 革兰阳性菌准确率为89.74%。传统法菌种鉴定和药敏报告总用时 ≥ 30 h, 本方法可缩短至9~18 h。**结论** 本方法由于减少了细菌转种培养时间, 可快速实现血培养标本的菌种鉴定和药敏检测, 且准确率满足临床需求, 有助于血流感染患者的快速诊断和治疗。

关键词: 血培养; 细菌鉴定; 药敏试验; VITEK MS质谱仪; VITEK2 Compact全自动微生物系统

中图分类号: R372 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-5087 (2023) 08-0732-05

Rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing assay in positive blood cultures

FAN Fanghua¹, WANG Xuan¹, ZHANG Yapei¹, XIAO Zhen¹, ZHOU Ying², DONG Shilei¹

1. Department of Microbiology Laboratory, Zhejiang Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310013, China; 2. Zhejiang Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310013, China

Abstract: Objective To establish a rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing assay in positive blood cultures, so as to provide insights into timely diagnosis and treatment of bloodstream infections. **Methods** A total of 1 154 blood culture samples were collected from inpatients in Zhejiang Hospital from February to May, 2022. The bacterial isolates were enriched and purified using improved separation gel method, and bacterial identification and antimicrobial susceptibility tests were performed using VITEK2 mass spectrometry system and VITEK2 Compact automated microbiology system. The accuracy of the new assay for bacterial identification and antimicrobial susceptibility tests was evaluated with the conventional VITEK 2 compact system as the standard. **Results** Of 1 154 blood culture specimens, the conventional VITEK 2 compact system detected 174 positives and 980 negatives. The new assay and the conventional VITEK 2 compact system identified consistent bacterial isolates in 165 out of 174 positive blood culture samples, and the accuracy of bacterial identification was 94.83% for the new assay, with a 99.21% accuracy for identifying Gram-negative bacteria and 82.22% for Gram-positive bacteria. Antimicrobial susceptibility tests were performed in 158 bacterial isolates, and the new assay presented a 90.17% accuracy, with a 90.27% accuracy for Gram-negative bacteria and 89.74% for Gram-positive bacteria. The conventional VITEK 2 compact system required 30 hours and longer to complete bacterial identification and antimicrobial susceptibility tests, and the new assay required

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2023.08.019

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目 (LGC19H190002)

作者简介: 范芳华, 硕士, 副主任技师, 主要从事临床微生物检验工作

通信作者: 董世雷, E-mail: dsl166@126.com

9 to 18 hours. **Conclusions** The new rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing assay shortens the time of bacterial culture, achieves rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing in blood culture specimens and has a high accuracy that meets clinical needs, which facilitates rapid diagnosis and treatment of bloodstream infections.

Keywords: blood culture; bacterial identification; antimicrobial susceptibility test; VITEK mass spectrometry system; VITEK2 Compact automated microbiology system

血流感染是病原微生物进入血液后引起的一种全身感染性疾病,有研究发现抗生素治疗每延迟 1 h,血流感染患者存活率平均下降 7.6%^[1-3]。血培养是目前诊断血流感染金标准^[4],其中病原菌的快速鉴定对早期血流感染的诊治至关重要,但阳性血培养标本传统方法需转种培养生长后再进行菌种鉴定和药敏试验,报告时间长达 36~48 h^[5]。研究发现阳性血培养细菌经分离纯化后直接进行质谱鉴定,可使鉴定时间缩短至 1~2 h^[6],而直接进行准确质谱鉴定的关键在于对病原菌进行高效分离和纯化。病原菌分离和纯化方法主要有去污剂选择裂解法、分离胶分离法、滤膜过滤法和短时液相培养法等^[7],其中分离胶分离法因操作简便、成本低廉,逐渐得到临床实验室的关注^[8]。

VITEK2 Compact 全自动微生物鉴定及药敏分析系统是临床微生物实验室广泛应用的一种菌种鉴定和药敏检测系统,检测结果稳定可靠,但对上机检测的细菌有较高的纯度和浓度要求。本研究通过改良分离胶分离法富集纯化阳性血培养细菌,使活菌浓度符合 VITEK2 Compact 系统检测要求,联用 VITEK MS 质谱仪和 VITEK2 Compact 全自动微生物系统,建立适合临床微生物实验室的阳性血培养菌种快速鉴定和药敏检测方法,为血流感染患者的及时诊断和治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Bact/ALERT 3D 全自动血培养仪及配套血培养瓶(法国生物梅里埃公司,批号:0001057906、001057556); VITEK2 Compact 全自动微生物鉴定及药敏分析仪,配套细菌鉴定、药敏卡(法国生物梅里埃公司,数据库版本 8.01); VITEK MS 质谱仪及样品处理基质液(法国生物梅里埃公司,数据库版本 3.2); 二氧化碳及普通培养箱(赛默飞世尔科技有限公司); Microfuge@22R Centrifuge 高速低温离心机(美国贝克曼库尔特公司); Baso 2005-1 低速离心机(中国台湾贝索企业有限公司); 真空分离胶促凝管(浙江康是医疗器械有限公司)。哥伦比亚血琼脂及营

养琼脂培养基(贝瑞特生物技术有限责任公司); 样本稀释液(法国生物梅里埃公司)。

1.2 方法

1.2.1 标本来源

收集 2022 年 2—5 月浙江医院住院患者血培养标本 1 154 份。研究通过浙江医院伦理委员会审查,审批号:2022 临审第(96K)号。

1.2.2 细菌富集纯化

采用改良分离胶分离法富集纯化菌体。从血培养阳性瓶中抽取 4.0 mL 标本至真空分离胶促凝管,1 240×g 离心 10 min,弃上清液。促凝管中加入 1 000 μL 样本稀释液,轻微上下颠倒混匀后转移至 1.5 mL 无菌 EP 管中,15 000×g 离心 3 min 后弃上清液。随后向 EP 管中加入 500 μL 样本稀释液,移液枪轻吹沉淀物斜面上的少量红细胞层悬浮并用枪头吸干,再加入 1 000 μL 样本稀释液吹打混匀后重复离心 1 次,弃上清液,如上 2 次洗涤后得到的沉淀物为较纯的灰白色菌泥。

1.2.3 活菌量检测

采用平板菌落计数法检测血培养阳性瓶菌体浓度。血培养仪器报警阳性后立即将报警瓶取出,轻轻颠倒混匀,取 4.0 mL 标本注入分离胶促凝管。另取 9 支无菌 EP 管,每管加入 900 μL 样本稀释液。从分离胶促凝管中吸取 100 μL 血培养阳性标本加入第 1 支 EP 管中,并依次倍比稀释,稀释倍数为 10¹~10⁹ 倍。混匀后每管吸取 10 μL 菌悬液点种至营养琼脂平板,每管至少重复 3 个点样。(35±1)℃ 孵育 18~24 h,计算菌落数。经分离胶促凝管离心富集、洗涤纯化后的细菌采用上述步骤计算活菌浓度。

1.2.4 菌种质谱鉴定

按照实验室 VITEK MS 质谱仪标准操作规程,取少量菌泥涂片、革兰染色,同时取 1.0 μL 菌泥均匀涂抹在 VITEK MS 质谱仪靶板孔上,每个样本涂 3 个重复孔,每孔加 1.0 μL 质谱样品处理基质液,待干燥后进行质谱鉴定。若染色结果为革兰阳性菌,则在每孔加基质液处理前,先加 0.5 μL 甲酸预处理。

1.2.5 快速药敏试验

按照实验室 VITEK2 Compact 系统标准操作规

程,取少量 1.2.2 中得到的菌泥制备 0.50~0.63 麦氏浊度菌悬液 (0.50 麦氏浊度=1.5×10⁸ CFU/mL)。采用 VITEK2 Compact 系统进行药敏试验,包括阿莫西林克拉维酸、哌拉西林他唑巴坦、头孢西丁、头孢呋辛、头孢他啶、头孢曲松、头孢哌酮舒巴坦、头孢吡肟、厄他培南、亚胺培南、美罗培南、阿米卡星、左氧氟沙星、替加环素、复方新诺明、青霉素、氨苄西林、苯唑西林、庆大霉素、莫西沙星、红霉素、克林霉素、力奈唑胺、达托霉素、替考拉宁、万古霉素和利福平等 27 种临床常用抗生素。

1.2.6 方法准确性评价

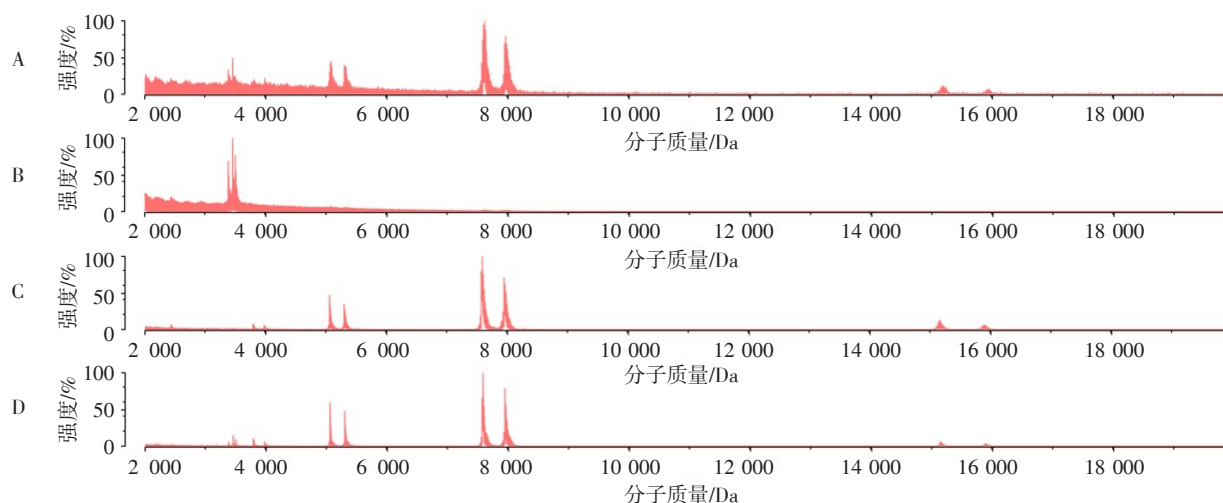
传统 VITEK2 Compact 检测方法 (以下简称传统法),即按照本实验室血培养标准操作规程取 100~200 μL 血培养瓶中阳性培养液转种至哥伦比亚血琼脂培养基,经 35 ℃ 孵育过夜,挑取培养基上的菌落制备成 0.50~0.63 麦氏浊度菌悬液,采用 VITEK2 Compact 系统同时进行菌种鉴定和药敏试验。1 154 份血培养标本采用传统法检测,阳性血培养标本 174 份,均为单一细菌感染;阴性血培养标本 980 份,培养 7 d 后经细菌涂片、转种培养结果呈阴性。以传统法检测结果为标准,检验本方法的准确性:阳性血

培养菌种鉴定准确率 (%) = (准确鉴定菌种株数/阳性血培养总株数) × 100%; 药敏检测准确率 (%) = (某项药敏检测结果与传统法完全一致的份数/该项药敏检测总份数) × 100%; 阴性血培养标本鉴定准确率 (%) = (准确鉴定血培养阴性份数/阴性血培养总份数) × 100%。

2 结果

2.1 菌种鉴定结果

本方法鉴定临床 1 154 份血培养标本,得到阴性结果 979 份,阳性结果 175 份 (1 份阴性标本被鉴定为奇异变形杆菌),阴性标本鉴定准确率为 99.90% (979/980)。对 174 份真阳性标本进行菌种鉴定,质谱分析上清液杂峰明显减少,细菌纯化程度较好,见图 1。1 株大肠埃希菌、4 株凝固酶阴性葡萄球菌、1 株星座链球菌、2 株解链球菌和 1 株鸟肠球菌采用本方法鉴定未能获得准确结果;其余 165 株菌种鉴定结果均与传统法一致。菌种鉴定准确率为 94.83% (165/174),其中革兰阴性菌鉴定准确率为 99.21% (125/126),革兰阳性菌为 82.22% (37/45)。



注: A 为含革兰阳性菌的血培养需氧瓶中培养物; B 为含革兰阳性菌的血培养厌氧瓶中培养物; C 为含革兰阴性菌的血培养需氧瓶中培养物; D 为含革兰阴性菌的血培养厌氧瓶中培养物。

图 1 4 种血培养标本菌种鉴定质谱峰图

Figure 1 Mass spectrogram for bacterial identification in four types of blood culture specimens

2.2 药敏试验结果

与传统法鉴定结果相符的 158 株菌 (1 株脆弱拟杆菌、1 株星座链球菌、2 株缓症链球菌、1 株微生子梭杆菌和 2 株地衣芽孢杆菌未做药敏试验)

进行药敏试验,准确率为 90.17%; 其中革兰阴性菌准确率为 90.27%, 革兰阳性菌准确率为 89.74%。见表 1、表 2。

2.3 本方法与传统法用时比较

表 1 革兰阴性菌药敏试验结果

Table 1 Antimicrobial susceptibility testing for Gram-negative bacterial isolates

抗生素	检测株数	与传统法结果一致株数	准确率/%
超广谱β内酰胺酶	90	78	86.67
阿莫西林克拉维酸	108	87	80.56
哌拉西林他唑巴坦	120	111	92.50
头孢西丁	101	98	97.03
头孢呋辛	112	91	81.25
头孢呋辛酯	112	90	80.36
头孢他啶	123	118	95.93
头孢曲松	108	101	93.52
头孢哌酮舒巴坦	124	116	93.55
头孢吡肟	123	118	95.93
厄他培南	107	102	95.33
亚胺培南	122	106	86.89
美罗培南	14	14	100.00
阿米卡星	121	120	99.17
左氧氟沙星	124	104	83.87
替加环素	128	108	84.37
复方新诺明	123	117	95.12
合计	1 860	1 679	90.27

158 份标本从血培养仪器报警阳性起，本方法的菌种鉴定时长为 50~60 min，传统法为≥30 h；最终报告时长传统法平均为 30.0~36.4 h，本方法可缩短为 9.0~18.0 h。见表 3。

3 讨论

本研究采用改良过的分离胶分离法富集纯化菌体，通过优化转速、时间和洗涤方法等参数，无需经乙醇沉淀菌体蛋白、甲酸/乙腈溶解提取^[8]或反复多次离心洗涤^[9]等过程，不仅操作简单省时，还能较好保持细菌活性^[10]，活菌浓度可达到 VITEK2 Compact 系统对富集纯化细菌直接进行药敏试验的要求。

改良分离胶分离法得到的细菌纯化物可直接进行菌种鉴定，鉴定结果准确率较高，为 94.83%。阴性血培养标本鉴定准确率为 99.90%，仅 1 份阴性血培养标本被鉴定为奇异变形杆菌，可能原因是质谱仪靶板污染。若待鉴定菌为革兰阳性菌，该菌涂质谱靶板孔后先加甲酸预处理，鉴定准确率会大大提高。有 1 株大肠埃希菌和 8 株革兰阳性球菌未能准确获得鉴定结果，可能原因是靶板或纯化物被污染，提示在实

表 2 革兰阳性菌药敏试验结果

Table 2 Antimicrobial susceptibility testing for Gram-positive bacterial isolates

抗生素	检测株数	与传统法结果一致株数	准确率/%
青霉素	27	26	96.30
氨苄西林	11	11	100.00
苯唑西林	24	23	95.83
头孢西丁	23	23	100.00
庆大霉素	23	20	86.96
左氧氟沙星	33	31	93.94
莫西沙星	23	23	100.00
诱导克林霉素耐药试验	21	20	95.24
耐甲氧西林葡萄球菌	23	23	100.00
红霉素	23	20	86.96
克林霉素	23	21	91.30
利奈唑胺	32	31	96.88
达托霉素	28	27	96.43
替考拉宁	28	5	17.86
万古霉素	34	28	82.35
替加环素	31	31	100.00
利福平	22	22	100.00
复方新诺明	23	23	100.00
合计	429	385	89.74

表 3 158 份临床阳性血培养标本传统法和本方法用时比较

Table 3 Comparison of the duration for bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing between the conventional VITEK 2 compact system and the new assay in 158 positive blood culture specimens

菌种	传统法用时/h	本方法用时/h
革兰阴性菌		
大肠埃希菌 (n=46)	30.2±2.0	10.7±1.9
肺炎克雷伯菌 (n=42)	30.3±1.3	10.8±1.3
其他肠杆菌科 (n=23)	32.5±1.8	13.0±1.6
鲍曼不动杆菌 (n=3)	30.0±2.3	9.6±0.4
铜绿假单胞菌 (n=4)	33.5±2.2	13.9±1.4
其他非发酵菌 (n=6)	35.8±2.3	15.8±1.8
革兰阳性菌		
其他葡萄球菌 (n=17)	32.1±1.7	12.4±2.7
肠球菌属 (n=8)	30.9±2.5	10.7±0.3
金黄色葡萄球菌 (n=5)	36.4±1.4	18.0±1.3
链球菌属 (n=4)	31.5±1.6	9.0±0.4

际操作过程中靶板的清洁和无菌操作至关重要。日常工作中,和涂片染色、转种培养相比,本方法对由于环境改变、电子噪音、血量过多或患者存在高白细胞或高红细胞状态引起仪器假阳性报警的确认也具有一定价值。

传统法最终报告时间为 36~48 h,难以满足血流感染患者的快速诊治要求。国内外虽已有快速药敏检测方法的报道,如分子方法检测耐药基因和基于 MALDI-TOF MS 技术的直接靶板微滴生长法等^[11],但这些方法多因应用范围局限、价格昂贵、操作复杂和可靠性差等问题,并未在普通临床实验室普及应用。本研究在细菌富集纯化后直接采用 VITEK2 Compact 系统进行药敏试验,准确率为 90.17%,与相关文献报道^[12]基本一致,一些关键抗生素如头孢他啶、头孢曲松、头孢哌酮舒巴坦、哌拉西林他唑巴坦、美罗培南、青霉素、氨苄西林、苯唑西林、头孢西丁和利奈唑胺的准确率均超过 90%,可满足临床应用需求。

本研究采用改良分离胶分离法富集纯化细菌,联用 VITEK MS 质谱仪和 VITEK2 Compact 系统可减少阳性血培养细菌转种培养时间,最终报告时间缩短至 9~18 h (传统法至少 30 h),其中细菌鉴定时间缩短至 1 h 以内,实现了对血培养标本的快速鉴定和药敏检测,准确性较高,有助于血流感染患者的快速诊断和治疗。本方法虽然较传统法更加高效,但仍存在真菌鉴定准确率低、不能有效鉴定 2 种及以上病原菌同时引起的血流感染等问题。今后将继续对现有技术平台进一步优化,探寻更加精确、高效的菌种鉴定和药敏检测新技术。

参考文献

- [1] CECCONI M, EVANS L, LEVY M, et al. Sepsis and septic shock [J]. *Lancet*, 2018, 392 (10141): 75-87.
- [2] RUDD K E, JOHNSON S C, AGESA K M, et al. Global, region-

al, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study [J]. *Lancet*, 2020, 395 (10219): 200-211.

- [3] KUMAR A, ROBERTS D, WOOD K E, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock [J]. *Crit Care Med*, 2006, 34 (6): 1589-1596.
- [4] 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.
- [5] PERI A M, HARRIS P, PATERSON D L. Culture-independent detection systems for bloodstream infection [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2022, 28 (2): 195-201.
- [6] ZENGIN C H, BAYRAKTAR B. Direct rapid identification from positive blood cultures by MALDI-TOF MS: specific focus on turnaround times [J/OL]. *Microbiol Spectr*, 2021, 9 (3) [2023-05-20]. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01103-21>.
- [7] 潘宏伟, 孙恩华. MALDI-TOF MS 直接鉴定阳性血培养病原菌的前处理方法选择 [J]. *中华检验医学杂志*, 2018, 41 (8): 563-566.
- [8] 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.
- [9] 谢小芳, 周惠琴, 郑毅, 等. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术直接鉴定血流感染病原菌的效果评价 [J]. *中华临床感染病杂志*, 2016, 4 (9): 152-155.
- [10] 上海医学会检验医学专科委员会临床微生物学组, 上海市微生物学会临床微生物专业委员会. 上海地区阳性血培养直接质谱快速检测规范 [J]. *中华检验医学杂志*, 2017, 40 (3): 165-168.
- [11] TANG H, LI R, XU H, et al. Direct-on-target microdroplet growth assay for detection of bacterial resistance in positive blood cultures [J]. *Infect Drug Resist*, 2021, 14: 4611-4617.
- [12] TSAI Y W, LIN T C, CHOU H Y, et al. Shortening the time of the identification and antimicrobial susceptibility testing on positive blood cultures with MALDI-TOF MS [J/OL]. *Diagnostics (Basel)*, 2021, 11 (8) [2023-05-20]. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11081514>.

收稿日期: 2023-02-23 修回日期: 2023-05-20 本文编辑: 吉兆洋