

基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法对MGIT960 阳性管中微生物的菌种鉴定

巨韩芳,穆成,赵慧,江丽娜,王春花*

天津市结核病控制中心参比实验室,天津市传染病病原微生物重点实验室,天津 300011

摘要:目的 应用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, MALDI-TOF MS)法对BACTEC™ MGIT960(简称“MGIT960”)仪器报告阳性的培养管中的微生物进行菌种鉴定,并分析不同菌株的分布情况。方法 收集2021—2022年天津市结核病控制中心参比实验室MGIT960仪器报告的阳性管2 662管,将液体培养物分别转种至血平板和中性罗氏培养基,对获得的分离株应用MALDI-TOF MS法进行鉴定,根据质谱结果将同一患者在同一种培养基上不重复的结果全部纳入菌种分布情况的构成比分析。对于质谱未检出的菌株,选取38株进行16S rRNA基因测序。结果 血平板共获得分离株605株,将501株纳入分析,其中分枝杆菌属占17.76%(89/501),以脓肿拟分枝杆菌10.18%(51/501)和偶发分枝菌酸杆菌3.19%(16/501)为主,分枝杆菌以外的细菌占68.06%(341/501),以皮疽诺卡菌15.57%(78/501)、痰液戈登氏菌9.38%(47/501)和支气管戈登氏菌7.58%(38/501)为主,71株未检出,占14.17%(71/501);中性罗氏培养基获得分离株2 378株,纳入1 748株进行分析,其中分枝杆菌属占78.72%(1 376/1 748),以结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)60.53%(1 058/1 748)、奇美拉胞内分枝杆菌组4.69%(82/1 748)、慢生黄分枝杆菌3.55%(62/1 748)为主,分枝杆菌以外的细菌占17.11%(299/1 748),以皮疽诺卡菌4.35%(76/1 748)、痰液戈登氏菌2.69%(47/1 748)和支气管戈登氏菌2.12%(37/1 748)为主,73株未检出,占4.18%(73/1 748)。38株质谱未检出的细菌经测序发现均为放线菌门和厚壁菌门的菌株。结论 MGIT960仪器报告阳性的培养管中非结核分枝杆菌(nontuberculous *Mycobacterium*, NTM)和分枝杆菌以外的细菌种类繁多,且绝大多数均可通过质谱快速鉴别。分枝杆菌以外的细菌以诺卡菌属和戈登氏菌属为主,应在鉴别诊断中关注此类细菌感染。

关键词:基质辅助激光解吸电离;结核;培养技术;分枝杆菌属

中图分类号:R446 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2023)11-1156-07

DOI:10.13604/j.cnki.46-1064/r.2023.11.06

Species identification of microorganisms in MGIT960 positive tubes by MALDI-TOF MS method

JU Hanfang, MU Cheng, ZHAO Hui, JIANG Lina, WANG Chunhua

Tuberculosis Reference Laboratory of Tianjin Center for Tuberculosis Control, Tianjin Key Laboratory of Pathogenic Microbiology of Infectious Disease, Tianjin 300011, China

Corresponding author: WANG Chunhua, E-mail: wchua1976@sina.com

Abstract: Objective To analyze the species distribution of microorganisms in culture tubes reported positive by BACTEC™ MGIT960 (hereafter referred to as "MGIT960") after species identification using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) technique. **Methods** From 2021 to 2022, a total of 2 662 positive tubes reported by the MGIT 960 instrument at Tuberculosis Reference Laboratory of Tianjin Center for Tuberculosis Control were collected. Liquid cultures were independently inoculated to blood plate and neutral L-J medium, and the resulting isolate strains were identified using the MALDI-TOF MS method. According to the MALDI-TOF MS results, the non-repetitive results of the same patient on the same culture medium were analyzed for the composition ratio of strain distribution. For the strains not identified by MALDI-TOF MS, 38 strains were selected for 16S rRNA gene sequencing. **Results** A total of 605 isolates were obtained from blood plates, and 501 of those were analyzed. Among them, *Mycobacterium* accounted for 17.76% (89/501), predominant by *Mycobacterium abscess* 10.18% (51/501) and *Mycobacterium fortuitum* 3.19% (16/501). Bacteria other than *Mycobacterium* accounted for 68.06% (341/501), with the main ones being *Nocardia farcinica* 15.57% (78/501), *Gordonia sputa* 9.38% (47/501) and *Gordonia bronchialis* 7.58% (38/501). There were 71 unidentifiable strains, making up 14.17% (71/501). A total of 2 378 strains were isolated from neutral L-J mediums, 1 748 of which were used in the incoming analysis. Among these, 78.72% (1 376/1 748) were *Mycobacterium*, 60.53% (1 058/1 748) were *Mycobacterium tuberculosis*

基金项目:天津市卫生健康委员会科技项目(No. ZC20202);天津市结核病控制中心科技基金项目(No. JHKJ202103);

天津卫生健康行业高层次人才选拔培养工程项目(No. TJSJMYXC-D2-017)

作者简介:巨韩芳(1981—),女,硕士,主管医师,研究方向:结核病实验室诊断。

***通信作者:**王春花, E-mail: wchua1976@sina.com

(MTB), 4.69% (82/1 748) were *Mycobacterium chimaer* intracellulare group and 3.55% (62/1 748) were *Mycobacterium Lentiflavum*. Bacteria other than *Mycobacterium* accounted for 17.11% (299/1 748) in neutral L-J medium isolates, with *Nocardia farcinica* 4.35% (76/1 748), *Gordonia sputa* 2.69% (47/1 748) and *Gordonia bronchialis* 2.12% (37/1 748) as the main species. There were 73 strains that couldn't be identified, comprising 4.18% (73/1 748). The 38 strains that not identified by MALDI-TOF MS were all found to be Actinobacteria and Firmicutes by sequencing. **Conclusions** A variety of nontuberculous *Mycobacterium* and bacteria other than *Mycobacterium* were found in the positive culture tubes reported by the MGIT960 instrument, most of which could be quickly identified by mass spectrometry. Bacteria other than *Mycobacterium* are mainly *Nocardia* and *Gordonia*, which should be paid attention to in differential diagnosis.

Keywords: matrix-assisted laser desorption-ionization; tuberculosis; culture techniques; *Mycobacterium*

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)培养阳性是实验室细菌学确诊结核病的金标准。BACTEC™ MGIT960(简称“MGIT960”)液体培养法因其阳性报告时间短及阳性率相对较高等优势,多年来一直被结核病实验室广泛应用。然而, MGIT960仪器报告阳性,并不能直接确定是否为分枝杆菌,而需先进行抗酸染色镜检,根据镜下菌体的颜色来初步判断是否为抗酸杆菌,并通过有无典型的条索状菌体形态来判断是否为分枝杆菌。然而近年来被发现的非结核分枝杆菌(nontuberculous *Mycobacterium*, NTM)的种类和数量均逐年上升,对于NTM的认识也在不断提高,仅仅依靠涂片很难将某些NTM和具有弱抗酸特点的其他菌株进行区分,还需进行菌种鉴定。传统的对硝基苯甲酸生长试验主要用于初步筛选NTM, MPT64抗原检测试剂盒可以快速筛选结核分枝杆菌复合群^[1],还有一些分子生物学方法如线性探针^[2]、基因芯片、荧光PCR熔解曲线技术也只能鉴定有限的NTM(≤19种)。对于MGIT960仪器报告的阳性液体培养物,有时需要多种方法联用才能给出最终判定,耗时长,成本高。

痰标本是结核检测中最常见的标本类型,它的成分非常复杂,通常含口腔、呼吸道内的正常菌群、条件致病菌或致病菌,虽然在分枝杆菌培养的标准化操作程序中会用NaOH进行标本前处理和和培养管中添加抑菌成分的方法尽可能的杀灭分枝杆菌以外的其他细菌,但实际上仍无法完全避免因“杂菌”生长而导致的MGIT960仪器报告阳性。

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, MALDI-TOF MS,简称“质谱”)是一种新型的软电离生物质谱技术,它是通过检测菌株蛋白组成成分以获得其质谱峰,与庞大图谱库内的标准质谱图进行比对达到鉴定细菌属、种的目的。凭借着其高通量、试剂低成本、操作简单、需菌量少,且可以快速鉴定出多种细菌和真菌的优势,迅速在临床微生物鉴定领域得到了广泛的应用。近年来也被应用于分枝杆菌的鉴定^[3],甚至是用于抗结核药物耐药性的研

究^[4]。本研究将MGIT960仪器报告阳性的液体培养物同时转种至2种培养基,对获得的固体培养物进行质谱鉴定,对菌种分布特征进行分析,从而探讨MGIT960适宜分离培养的菌种类型、天津市NTM的菌种分布以及阳性管中其他细菌的分布情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本采集 收集天津市结核病控制中心参比实验室2021—2022年MGIT960仪器报告阳性的培养管共2 662管。标本来源包括门诊疑似结核病患者和确诊患者的痰标本2 594份,尿液标本56份,胸腔积液标本5份,粪便标本4份,肺泡灌洗液标本2份和经血标本1份。每名患者、每次、每个标本类型仅收集1份标本进行MGIT960液体培养,每份标本只培养1管,但不排除同一患者在不同治疗时期多次申请MGIT960液体培养。进行质谱检测后,对于同一患者在同一种固体培养基上质谱结果相同的菌株仅纳入一份,剔除其余重复结果,质谱未检出的菌株视为不同菌株纳入分析。

1.1.2 主要仪器与试剂 MGIT960全自动分枝杆菌快速培养系统(美国BD公司),低温恒温培养箱(日本SANYO),Bruker Maldi Biotyper质谱仪(德国Bruker公司),金属浴(德国Peqlab公司),centrifuge 5424离心机(德国Eppendorf公司),振荡仪(广州艾卡仪器设备有限公司),PCR扩增仪(德国Eppendorf公司),MGIT960培养管(美国BD公司),血液琼脂培养基(沈阳彦程生物制品有限公司),中性罗氏培养基(珠海贝索生物技术有限公司),甲酸、乙腈、基质、0.5 mm氧化锆珠(德国Bruker公司)。

1.2 研究方法

1.2.1 固体培养 同时采用血液琼脂培养基(简称“血平板”)和中性罗氏培养基进行分离培养,操作如下:用吸管轻轻吹打混匀MGIT960阳性管中的菌液,使其沉淀悬浮,分别取100 μL接种于2种培养基上,将其置于(36±1)℃孵育。每日观察血平板,连续观察2~3 d;每周检查1次中性罗氏培养基上的菌落生长状态,观察6~8周。当2种固体培养基上出现10 μL接

种环约半环的菌落即可进行质谱菌种鉴定。

1.2.2 质谱菌种鉴定 先用 10 μL 接种环刮取半环菌落,放置于装有 300 μL 去离子水的 Eppendorf 管中(避免刮取培养基);99 °C 金属浴加热 30 min,灭活菌株;冷却后加入 900 μL 无水乙醇,涡旋振荡 30 s 将其充分混匀;18 407×g 离心 3 min;用移液器尽量去除所有上清,室温开盖晾干;加入适量 0.5 mm 氧化锆微珠,加入 30 μL 乙腈,全速涡旋振荡 1 min;加入 30 μL 70% 甲酸溶液,涡旋振荡 30 s;18 407×g 离心 3 min;取 1 μL 上清在 MALDI 靶板上点样,室温晾干;添加 1 μL 基质溶液,室温晾干;上机进行质谱检测和鉴定,记录鉴定结果和分值。

1.2.3 16S rRNA 基因测序 选取 38 株质谱未检出的菌株,用 10 μL 接种环挑取一满环待测菌株,采用 CTAB 法提取细菌 DNA。设计引物对 16S rRNA 基因进行扩增,上游引物序列 5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3',下游引物序列 5'-TACGGCTACCTTGT-TACGACTT-3',扩增产物大小为 1 500 bp 左右。对扩增产物进行测序,测序委托上海晶诺生物科技有限公司完成。

1.3 统计学分析 将纳入分析的质谱鉴定结果应用 Excel 2007 进行统计描述和分析,计数资料“菌株数”以“构成比(%)”描述。

2 结果

2.1 转种后获得分离株及纳入分析情况 2 662 管 MGIT960 阳性液体培养物转种于血平板共获得分离株 605 株(605/2 662, 22.73%),其余均未见菌落生长。根据质谱检测结果剔除同一患者结果重复的菌株共 104 株后,将 501 株血平板分离株纳入菌种分布情况的分析(表 1)。

2 662 管 MGIT960 阳性培养物转种于中性罗氏培养基后,除未见菌落生长外,尚有 72 支培养基因变绿、开裂、液化而无法获得有效菌株,因此共获得分离株 2 378 株(2 378/2 662, 89.33%)。根据质谱检测结果剔除同一患者结果重复的菌株共 630 株后,将 1 748 株中性罗氏培养基分离株纳入菌种分布情况的分析(表 2)。

2.2 血平板分离株的菌种分布情况 501 份血平板上共获得分枝杆菌属的菌株 89 株(17.76%),其中以脓肿拟分枝杆菌 51 株(10.18%)、偶发分枝菌酸杆菌 16 株(3.19%)、偶发分枝菌酸杆菌复合群 5 株(1.00%)和玛格丽特分枝菌酸杆菌 5 株(1.00%)为主;分枝杆菌以外的其他细菌共 341 株(68.06%),可分为 71 种,其中以皮疽诺卡菌 78 株(15.57%)、痰液戈登氏菌 47 株(9.38%)和支气管戈登氏菌 38 株

(7.58%)为主;此外还有 71 株因无“质谱峰”或得分较低而未能获得可信的质谱鉴定结果。

表 1 501 份血平板分离株的菌种分布情况
Table 1 Strain distribution of 501 blood plate isolates

| 质谱鉴定结果 Identification results by mass spectrometry | 菌株数 Strain number | 构成比 Proportion/% |
|--------------------------------------------------------------|-------------------|------------------|
| 分枝杆菌属 <i>Mycobacterium</i> | 89 | 17.76 |
| 脓肿拟分枝杆菌 <i>M. abscessus</i> | 51 | 10.18 |
| 偶发分枝菌酸杆菌 <i>M. fortuitum</i> | 16 | 3.19 |
| 偶发分枝菌酸杆菌复合群 <i>M. fortuitum complex</i> | 5 | 1.00 |
| 玛格丽特分枝菌酸杆菌 <i>M. mageritense</i> | 5 | 1.00 |
| 塞内加尔分枝杆菌 <i>M. senegalense</i> | 3 | 0.60 |
| 沃林斯基分枝菌酸杆菌 <i>M. uplinskyi</i> | 3 | 0.60 |
| 副戈登分枝杆菌 <i>M. paragordoniae</i> | 2 | 0.40 |
| 龟拟分枝杆菌 <i>M. chelonae</i> | 2 | 0.40 |
| 猪分枝杆菌 <i>M. porcinum</i> | 1 | 0.20 |
| 丝背鳞鲑鱼拟分枝杆菌 <i>M. stephanolepidis</i> | 1 | 0.20 |
| 其他细菌 Other bacteria | 341 | 68.06 |
| 皮疽诺卡菌 <i>Nocardia farcinica</i> | 78 | 15.57 |
| 痰液戈登氏菌 <i>Gordonia sputi</i> | 47 | 9.38 |
| 支气管戈登氏菌 <i>Gordonia bronchialis</i> | 38 | 7.58 |
| 表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 19 | 3.79 |
| 乳酪短杆菌 <i>Brevibacterium casei</i> | 15 | 2.99 |
| 蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i> | 13 | 2.59 |
| 速生短杆菌 <i>Brevibacterium celere</i> | 12 | 2.40 |
| 溶酪氨酸家村氏菌 <i>Tsakumurella tyrosinosolvans</i> | 12 | 2.40 |
| 其他 63 种细菌(菌株数<10 株) 63 other bacteria (number of strains<10) | 107 | 21.36 |
| 质谱未检出 Not detected by mass spectrometry | 71 | 14.17 |
| 合计 Total | 501 | 100.00 |

注:其他细菌的中文译名来自 Bruker MALDI Biotyper 第 12 版主库(DB-11897-4274)。Note: Chinese translations of other bacteria are from Bruker MALDI Biotyper 12 (DB-11897-4274)。

2.3 中性罗氏培养基上分离株菌种分布情况 1 748 份中性罗氏培养基上共获得分枝杆菌属的菌株 1 376 株(78.72%),其中 MTB 1 058 株(60.53%),NTM 318 株(18.19%)。NTM 可分为 23 种,以奇美拉胞内分枝杆菌组 82 株(4.69%)、慢生黄分枝杆菌 62 株(3.55%)和脓肿拟分枝杆菌 53 株(3.03%)为主;分枝杆菌以外的其他细菌共 299 株(17.11%),可分为 57 种,其中以皮疽诺卡菌 76 株(4.35%)、痰液戈登氏菌 47 株(2.69%)和支气管戈登氏菌 37 株(2.12%)为主;此外还有 73 株因无“质谱峰”或得分较低而未能获得可信的质谱鉴定结果。

2.4 38株质谱未检出菌株的测序鉴定结果 本研究有71株血平板分离株和73株中性罗氏培养基分离株在质谱检测中因未获得质谱峰或得分较低、结果不可信而未得到菌种鉴定结果,从中选取38株经DNA提取、PCR扩增后进行16S rRNA基因测序,共得到12个属,20个种的菌株,其中27株鉴定为16个种,属于放

线菌门、放线菌纲(马杜拉放线菌属、戈登氏菌属、诺卡氏菌属、束村氏菌属、链霉菌属、纤维微细菌属、短小杆菌属和利夫森菌属),11株鉴定为7个种,属于厚壁菌门、芽孢杆菌纲(短芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、假芽孢杆菌属和芽孢杆菌属)。20个种中有7个种的菌株未在质谱数据库中(表3)。

表2 1748份中性罗氏培养基分离株质谱鉴定的菌种分布情况

Table 2 Distribution of 1748 neutral Roche culture-medium isolates identified by mass spectrometry

| 质谱鉴定结果 Identification results by mass spectrometry | 菌株数 Strain number | 构成比 Proportion/% | 质谱鉴定结果 Identification results by mass spectrometry | 菌株数 Strain number | 构成比 Proportion/% |
|----------------------------------------------------|-------------------|------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------|------------------|
| 分枝杆菌属 <i>Mycobacterium</i> | 1376 | 78.72 | 蟾蜍分枝杆菌 <i>M. xenopi</i> | 1 | 0.06 |
| 结核分枝杆菌 <i>M. tuberculosis</i> | 1058 | 60.53 | 猪分枝杆菌 <i>M. porcinum</i> | 1 | 0.06 |
| 奇美拉胞内分枝杆菌组 <i>M. chimera intracellulare group</i> | 82 | 4.69 | 加那利群岛分枝杆菌 <i>M. canariensis</i> | 1 | 0.06 |
| 慢生黄分枝杆菌 <i>M. lentiflavum</i> | 62 | 3.55 | 草分枝杆菌 <i>M. phlei</i> | 1 | 0.06 |
| 脓肿拟分枝杆菌 <i>M. abscessus</i> | 53 | 3.03 | 产黏液分枝杆菌 <i>M. mucogenicum</i> | 1 | 0.06 |
| 堪萨斯分枝杆菌 <i>M. kansasii</i> | 35 | 2.00 | 副瘰癧分枝杆菌 <i>M. parascrofulaceum</i> | 1 | 0.06 |
| 鸟分枝杆菌 <i>M. avium</i> | 16 | 0.92 | 苏尔加分枝杆菌 <i>M. szulgai</i> | 1 | 0.06 |
| 偶发分枝杆菌 <i>M. fortuitum</i> | 14 | 0.80 | 外来分枝杆菌 <i>M. peregrinum</i> | 1 | 0.06 |
| 戈登分枝杆菌 <i>M. goodii</i> | 11 | 0.63 | 其他菌株 Other strains | 299 | 17.11 |
| 龟拟分枝杆菌 <i>M. chelonae</i> | 6 | 0.34 | 皮疽诺卡菌 <i>Nocardia farcinica</i> | 76 | 4.35 |
| 副戈登分枝杆菌 <i>M. paragoodii</i> | 6 | 0.34 | 痰液戈登氏菌 <i>Gordonia sputi</i> | 47 | 2.69 |
| 玛格丽特分枝杆菌 <i>M. mageritense</i> | 5 | 0.29 | 支气管戈登氏菌 <i>Gordonia bronchialis</i> | 37 | 2.12 |
| 偶发分枝杆菌复合群 <i>M. fortuitum complex</i> | 5 | 0.29 | 表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 17 | 0.97 |
| 土分枝杆菌 <i>M. terrae</i> | 5 | 0.29 | 乳酪短杆菌 <i>Brevibacterium casei</i> | 14 | 0.80 |
| 塞内加尔分枝杆菌 <i>M. senegalense</i> | 4 | 0.23 | 速生短杆菌 <i>Brevibacterium celere</i> | 12 | 0.69 |
| 马萨分枝杆菌 <i>M. marseillense</i> | 3 | 0.17 | 溶酪氨酸豕村氏菌 <i>Tsukamurella tyrosinosolvens</i> | 12 | 0.69 |
| 沃林斯基分枝杆菌 <i>M. wplinskyi</i> | 2 | 0.11 | 其他50种细菌(菌株数<10株) 50 other bacteria (number of strains<10) | 84 | 4.81 |
| 布里斯班分枝杆菌 <i>M. brisbanense</i> | 1 | 0.06 | 质谱未检出 Not detected by mass spectrometry | 73 | 4.18 |
| | | | 合计 Total | 1748 | 100.00 |

注:a.又名缓黄分枝杆菌^[6]。其他细菌的中文译名来自Bruker MALDI Biotyper 第12版主库(DB-11897-4274)。Note: a. Also known as *Mycobacterium avium*; The Chinese name of the other bacteria were taken from the Bruker MALDI Biotyper version 12 master library (DB-11897-4274).

表3 38株质谱未检出菌株的测序鉴定结果

Table 3 Sequencing results of 38 strains not detected by mass spectrometry

| 序号 | 属名 Generic name | 种名 Specific name | 质谱库中文名 Chinese name for mass spectrum library | 菌株数 Strain number |
|----|-----------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------|
| 1 | 马杜拉放线菌属 | <i>Actinomyces geliboluensis</i> | 无 | 1 |
| 2 | 戈登氏菌属 | <i>Gordonia oryzae</i> | 无 | 1 |
| 3 | 戈登氏菌属 | <i>Gordonia aichiensis</i> | 爱知戈登氏菌 | 4 |
| 4 | 戈登氏菌属 | <i>Gordonia sputi</i> | 痰液戈登菌 | 4 |
| 5 | 诺卡氏菌属 | <i>Nocardia asteroides</i> | 星形诺卡菌 | 1 |
| 6 | 束村氏菌属 | <i>Tsukamurella hominis</i> | 无 | 3 |
| 7 | 束村氏菌属 | <i>Tsukamurella ocularis</i> | 无 | 1 |
| 8 | 束村氏菌属 | <i>Tsukamurella inchonensis</i> | 仁川豕村氏菌 | 2 |
| 9 | 链霉菌属 | <i>Streptomyces enissocaesilis</i> | 无 | 2 |
| 10 | 链霉菌属 | <i>Streptomyces thermodiastaticus</i> | 无 | 1 |
| 11 | 纤维微细菌属 | <i>Cellulosimicrobium funkei</i> | 芬氏纤维微菌 | 1 |
| 12 | 短小杆菌属 | <i>Curtobacterium pusillum</i> | 极小短小杆菌 | 1 |

续表3

| 序号 | 属名 Generic name | 种名 Specific name | 质谱库中文名 Chinese name for mass spectrum library | 菌株数 Strain number |
|----|-----------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------|
| 13 | 利夫森菌属 | <i>Leifsonia shinshuensis</i> | 信州利夫森菌 | 5 |
| 14 | 短芽孢杆菌属 | <i>Brevibacillus parabrevis</i> | 副短短芽孢杆菌 | 1 |
| 15 | 短芽孢杆菌属 | <i>Brevibacillus agri</i> | 土壤短芽孢杆菌 | 1 |
| 16 | 类芽孢杆菌属 | <i>Paenibacillus cineris</i> | 火山(灰土)类芽孢杆菌 | 2 |
| 17 | 类芽孢杆菌属 | <i>Paenibacillus chitinolyticus</i> | 解几丁质类芽孢杆菌 | 1 |
| 18 | 假芽孢杆菌属 | <i>Fictibacillus gelatini</i> | 无 | 1 |
| 19 | 芽孢杆菌属 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 解淀粉芽孢杆菌 | 1 |
| 20 | 芽孢杆菌属 | <i>Bacillus cereus</i> | 蜡样芽孢杆菌 | 4 |

注:质谱库中文名来自Bruker MALDI Biotyper 第12版主库(DB-11897-4274)。

Note: The Chinese name of the mass spectrum library is from Bruker MALDI Biotyper 12 (DB-11897-4274).

3 讨论

分枝杆菌的分离培养是目前诊断肺结核的金标准, MGIT960液体培养以其阳性率高, 报告时间短, 且能通过仪器自动判读报告结果等优势被结核实验室广泛应用。然而除了MTB和NTM这些分枝杆菌外, 还有很多“杂菌”也能导致MGIT960仪器报告阳性, 而对于这些分枝杆菌以外细菌的研究报道极少。为了探讨除了MTB和NTM以外, 造成MGIT960仪器报告阳性的其他细菌的种类和分布情况, 本研究采用MALDI-TOF-MS质谱法系统性的对从MGIT960阳性管中获得的固体培养物进行检测和分析。结果发现, 一定比例的条件致病菌如皮疽诺卡菌、痰液戈登氏菌和支气管戈登氏菌被检出, 这提示在可疑结核病人中可能存在一定比例的该类患者, 且MGIT960也可以用于该类菌株的分离培养。此外, 血平板和质谱的联合应用有利于快速生长NTM和分枝杆菌以外的其他菌株的早期鉴别诊断。

本研究将MGIT960液体培养物同时转种至血平板和中性罗氏培养基有以下几点考虑: (1) 中性罗氏培养基作为分枝杆菌的选择性培养基, 其内所含的孔雀绿会抑制部分细菌的生长, 因此本研究选用了血平板作为补充, 以获得更多种类的细菌。(2) 虽然有报道直接用液体培养物进行质谱检测, 但考虑到液体培养基和添加剂等成分对质谱检测的干扰, 为了提高检出率^[7], 本研究选择应用分离培养后的固体培养物进行质谱检测。

在临床上, 结核病和NTM病之间, 不同的NTM病之间, 用药种类和疗程均有所不同^[8], 因此准确快速的菌种鉴定对结核病、NTM病以及其他细菌感染的鉴别诊断及治疗方案的制定具有重要的价值。吴祥兵等^[9]发现与目前最常用的基因芯片试剂盒相比质谱法在NTM鉴定的菌种数量、分辨能力、时间和经济成本都要更优。本研究通过质谱技术检出了NTM多达20余种, 包括目前商品化试剂盒无法区分的龟-脓肿拟

分枝杆菌和鸟-胞内分枝杆菌以及商品化试剂盒无法检出的慢生黄分枝杆菌、玛格丽特分枝杆菌、塞内加尔分枝杆菌等十余种分枝杆菌。本次检出占比最多的是奇美拉胞内分枝杆菌组(Bruker质谱将*M. chimaer*和*M. intracellulare*归为一组进行报告), 其次是慢生黄分枝杆菌、脓肿拟分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、鸟分枝杆菌、偶发分枝菌酸杆形菌属、戈登分枝杆菌等。本研究中慢生黄分枝杆菌分离率高居NTM的第2位, 但该菌株在国内外均极少报道, 这可能是由于目前的商品化试剂盒尚无法检出该菌株, 而仅靠镜下的细菌形态很难判定其是否为NTM, 且其本身生长非常缓慢, 有时仪器报告阳性已接近42 d, 此时菌量较少, 再转种至中性罗氏培养基后菌落生长仍需较长时间, 实验室很容易将其报告为阴性。而它在患者体内是呼吸道定植菌还是致病菌亦或是水污染所致还需结合临床做进一步判别^[10]。

与医学相关的重要需氧放线菌有许多, 如诺卡氏菌属、马杜拉放线菌属、链霉菌属、红球菌属、戈登菌属、塚村氏菌属等。本研究中发现的分枝杆菌以外的细菌以皮疽诺卡菌、痰液戈登氏菌和支气管戈登氏菌最为多见, 其检出的数量已接近最常见的NTM, 随着新检测方法的不断出现, 这些条件致病菌引起的人类疾病也逐渐被认识^[11-13]。在2009—2021年中国诺卡菌流行病学研究中也发现, 皮疽诺卡菌在诺卡菌属中占比最高(39.9%, 176/441)^[14]。该菌在MGIT960培养管中生长良好, 由于它和分枝杆菌具有相似的染色特征和形态特征, 很容易被误诊为肺结核或NTM病^[15-16]。柳晓金等^[17]对结核病专科医院中24例诺卡菌病患者进行分析后发现这些患者均存在不同程度的误诊。研究发现诺卡菌感染的患者多为免疫功能受损或有基础病(包括支气管扩张、糖尿病、慢性阻塞性肺疾病)的患者, 该类患者也易于合并结核菌的感染^[18-19]。因此, 在对可疑结核患者进行鉴别诊断时, 还应考虑到患者是否具有条件致病菌感染的高危因

素,考虑到皮疽诺卡菌、痰液戈登氏菌和支气管戈登氏菌等感染的可能性。虽然痰标本中分离到的这类菌株有可能为定植菌,但是在本次研究中检出率较高,应引起实验室和临床的重视,做好鉴别诊断。

本研究检出分枝杆菌以外的菌株多达70余种,有一些常见菌如人体正常携带菌群表皮葡萄球菌在MGIT960阳性管中被检出,考虑可能与操作环境有关,也可能与操作中手套接触过皮肤或其他污染物品有关,提示应注意操作规范和实验室物品的消毒灭菌^[20]。一些MGIT960管内液体较浑浊,转种至中性罗氏培养基后培养基发生变绿、液化等污染现象,此类菌株在血平板上生长良好,经质谱检测多属芽孢菌科,其中以蜡样芽孢杆菌较多见,这提示应注意实验室环境的细菌污染,特别是生物安全柜内的清洁和物品的消毒。此外,也发现了一些罕见菌,如短杆菌、冢村氏菌等,此类菌株的来源以及致病性还需更深入的研究。

质谱检测仍具有一定的局限性,本研究中无论是血平板还是中性罗氏培养基上均有质谱未检出的菌株,测序发现7个种的菌株未在质谱库中,有的菌株虽然在质谱库中,但是质谱检测得分较低,可能是商品化数据库提供的图谱与临床中出现的同种菌株质谱图并不完全吻合,这些问题有待于通过自建库或数据库的优化得以解决^[21]。有的菌株在质谱检测中未能获得有效的质谱峰,则可能与多种因素有关^[22],有研究发现通过调整菌株的孵育时间、研磨珠的选择、破壁步骤的优化等方式可以提高质谱的检出率^[23],也有研究在菌株灭活后通过冷冻和组织匀浆机的应用也提高了检出效率^[7]。

总之,MGIT960仪器报告阳性的培养管中,不仅要鉴别MTB和NTM,也应关注分枝杆菌以外的其他细菌尤其是条件致病菌。质谱技术简便、快速、试剂成本低且可以进行高通量检测,适用于MTB、NTM和多种其他细菌的鉴定。对于罕见菌的来源及其致病性还有待深入研究。

伦理审查与知情同意 本研究不涉及伦理批准,各项检测和治疗均获得患者知情同意

利益冲突声明 所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

[1] CAO X J, LI Y P, WANG J Y, et al. MPT64 assays for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. BMC Infect Dis, 2021, 21(1): 336.

[2] 朱玉梅, 钟育权, 李金莉, 等. 线性探针法用于分枝杆菌菌种快速鉴定的应用研究[J]. 新发传染病电子杂志, 2022, 7(2): 47-51.

ZHU Y M, ZHONG Y Q, LI J L, et al. Evaluation of GenoType *Mycobacterium* CM for the rapid identification of non-tuberculous myco-

bacteria[J]. Electron J Emerg Infect Dis, 2022, 7(2): 47-51.(in Chinese)

- [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. 综合医院结核分枝杆菌感染实验室检查共识[J]. 中华检验医学杂志, 2022, 45(4): 343-353.
- [4] 余艳芳, 赵开顺, 屠春林, 等. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱在结核分枝杆菌耐药检测中的应用价值研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2021, 29(10): 106-112.
- YU Y F, ZHAO K S, TU C L, et al. Application value of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in the detection of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Pract J Cardiac Cereb Pneu Pulm Vasc Dis, 2021, 29(10): 106-112.(in Chinese)
- [5] 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 中国防痨协会人兽共患结核病专业分会. 分枝杆菌菌种中文译名专家共识[J]. 中国人兽共患病学报, 2023, 39(3): 205-220.
- [6] 初万惠, 段鸿飞. 非结核分枝杆菌病诊断与治疗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2019.
- [7] DAVID R T, DANIEL P R, STRUZKA EDUARDO A, et al. Evaluation of two protein extraction protocols based on freezing and mechanical disruption for identifying nontuberculous *mycobacteria* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry from liquid and solid cultures[J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(4): e01548-17.
- [8] 中华医学会结核病学分会. 非结核分枝杆菌病诊断与治疗指南(2020年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2020, 43(11): 918-946.
- Chinese Medical Association Tuberculosis Branch. Guidelines for diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial diseases (2020 edition)[J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2020, 43(11): 918-946. (in Chinese)
- [9] 吴祥兵, 吴联朋, 项领, 等. DNA微阵列芯片与质谱技术快速鉴定非结核分枝杆菌的差异性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2022, 32(1): 16-20.
- WU X B, WU L P, XIANG L, et al. Difference in rapid identification of nontuberculous *Mycobacteria* between DNA microarray chip and MALDI-TOF MS[J]. Chin J Nosocomiology, 2022, 32(1): 16-20. (in Chinese)
- [10] ARFAATABAR M, KARAMI P, KHALEDI A. An update on prevalence of slow-growing *mycobacteria* and rapid-growing *mycobacteria* retrieved from hospital water sources in Iran - a systematic review [J]. Germs, 2021, 11(1): 97-104.
- [11] 陈少金, 麦文慧, 朱雄, 等. 1例痰液戈登菌致血流感染误诊中毒性红斑病例分析[J]. 中国热带医学, 2021, 21(9): 900-902.
- CHEN S J, MAI W H, ZHU X, et al. A case of bloodstream infection caused by *Gordonia* in sputum misdiagnosed as toxic erythema[J]. China Trop Med, 2021, 21(9): 900-902.(in Chinese)
- [12] FRANZCZUK M, KLATT M, FILIPCZAK D, et al. From NTM (nontuberculous *mycobacterium*) to *Gordonia bronchialis*—a diagnostic challenge in the COPD patient[J]. Diagnostics, 2022, 12(2): 307.
- [13] ERIBI A, AL-AMRI K, AL-JABRI A, et al. *Gordonia sputi* related multiple brain abscesses, an AIDS-presenting illness: Thinking outside the box[J]. IDCases, 2020, 21: e00906.
- [14] WANG H, ZHU Y, CUI Q Z, et al. Epidemiology and antimicrobial resistance profiles of the *Nocardia* species in China, 2009 to 2021

- [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(2): e0156021.
- [15] 张晨露, 崔岩飞, 杨盛娅, 等. 播散性皮疽诺卡菌病误诊肺结核一例[J]. *中国防痨杂志*, 2022, 44(10): 1104-1106.
- [16] DONG G W, CHU P, GUO J, et al. Nontuberculous mycobacterial and *Nocardia* infections mimicking pulmonary tuberculosis: a retrospective study of a general hospital patient population in China[J]. *Journal of medical microbiology*, 2019, 69(9): 1145-1150.
- [17] 柳晓金, 杨娜, 程欢欢, 等. 结核病专科医院24例诺卡菌临床特征分析[J]. *中国热带医学*, 2022, 22(2): 177-180.
LIU X J, YANG N, CHENG H H, et al. Clinical analysis of 24 cases of nocardiasis in a tuberculosis hospital[J]. *China Trop Med*, 2022, 22(2): 177-180.(in Chinese)
- [18] 程琰, 高杰英, 顾江, 等. 10例诺卡菌感染的病原学鉴定和临床特征[J]. *中国微生态学杂志*, 2022, 34(6): 690-696.
CHENG Y, GAO J Y, GU J, et al. Identification, clinical characteristics and antimicrobial susceptibility of 10 clinical *Nocardia* infection cases[J]. *Chin J Microecol*, 2022, 34(6): 690-696.(in Chinese)
- [19] 韩云港, 韩俊垒, 陈会会, 等. 42例肺诺卡菌病患者的临床特征及其病原菌耐药性[J]. *中国感染控制杂志*, 2022, 21(7): 668-674.
HAN Y G, HAN J L, CHEN H H, et al. Clinical characteristics and antimicrobial resistance of pathogens of 42 patients with pulmonary nocardiasis[J]. *Chin J Infect Control*, 2022, 21(7): 668-674.(in Chinese)
- [20] 杜强, 姚萍, 毛旭建, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在车间洁净室污染同源性分析中的应用[J]. *公共卫生与预防医学*, 2021, 32(5): 43-47.
DU Q, YAO P, MAO X J, et al. Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in the analysis of the pollution homology of clean room in workshop[J]. *J Public Health Prev Med*, 2021, 32(5): 43-47.(in Chinese)
- [21] 黄磊. 诺卡菌分子鉴定方法的研究进展[J]. *检验医学与临床*, 2018, 15(18): 2814-2817.
HUANG L. Research progress on molecular identification methods of *Nocardia*[J]. *Lab Med Clin*, 2018, 15(18): 2814-2817.(in Chinese)
- [22] TOPIĆ POPOVIĆ N, KAZAZIĆ S P, BOJANIĆ K, et al. Sample preparation and culture condition effects on MALDI-TOF MS identification of bacteria: a review[J]. *Mass Spec Rev*, 2023, 42(5): 1589-1603.
- [23] 杜若青, 秦中华, 张丽霞. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术对分枝杆菌液体培养系统菌种鉴定的临床研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2021, 37(10): 871-877.
DU Y Q, QIN Z H, ZHANG L X. Clinical study on the identification of *Mycobacterium* liquid culture system by matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry[J]. *Chin J Zoonoses*, 2021, 37(10): 871-877.(in Chinese)

收稿日期:2023-08-30 编辑:陈景丽 黄艳

(上接第1145页)

- more[J]. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 2018, 8(1): 1.
- [11] 周毓青. 表达双链RNA的苏云金芽孢杆菌HD73的构建及其对小菜蛾的作用[D]. 福州: 福建农林大学, 2020.
ZHOU Y Q. Construction of DsRNA-expressing *Bacillus thuringiensis* HD73 and its effect on *Plutella xylostella*[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2020. (in Chinese)
- [12] PARK M G, KIM W J, CHOI J Y, et al. Development of a *Bacillus thuringiensis* based dsRNA production platform to control saebrood virus in *Apis cerana*[J]. *Pest Manag Sci*, 2020, 76(5): 1699-1704.
- [13] JIANG Y X, CHEN J Z, LI M W, et al. The combination of *Bacillus thuringiensis* and its engineered strain expressing dsRNA increases the toxicity against *Plutella xylostella*[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 444.
- [14] BERROW N S, ALDERTON D, OWENS R J. The precise engineering of expression vectors using high-throughput In-fusion™ PCR cloning[M]// *High Throughput Protein Expression and Purification*, 2009: 75-90.
- [15] ZHU B G, CAI G F, HALL E O, et al. In-Fusion™ assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations[J]. *BioTechniques*, 2007, 43(3): 354-359.
- [16] CHEN J, WU Y C, LU H R, et al. A novel lethal cuticular structural protein, AaCPR100A and its upstream interaction protein, G12-like, function in cuticle and egg shell formation in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*[J]. *BioRxiv*, 2023: 527159.
- [17] WANG H C, WANG Q H, BHOWMICK B, et al. Functional characterization of two clip domain serine proteases in innate immune responses of *Aedes aegypti*[J]. *Parasites Vectors*, 2021, 14(1): 1-13.
- [18] WANG Q H, WANG H, ZHANG Y, et al. Functional analysis reveals ionotropic GABA receptor subunit RDL, is a target site of ivermectin and fluralaner in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*[J]. *Pest Management Science*, 2022, 78(10): 4173-4182.
- [19] WU Q, LI C X, LIU Q M, et al. RNA interference of odorant receptor CquiOR114/117 affects blood-feeding behavior in *Culex quinquefasciatus*[J]. *Acta Trop*, 2020, 204: 105343.
- [20] ARANTES O, LERECLUS D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*[J]. *Gene*, 1991, 108(1): 115-119.
- [21] 孙明, 刘子铎, 李林, 等. 细菌基因工程杀虫剂研究进展[J]. *中国病毒学*, 2000, 15(S1): 19-26.
SUN M, LIU Z D, LI L, et al. Recent development of engineered bacterial pesticides[J]. *Virol Sin*, 2000, 15(S1): 19-26.(in Chinese)
- [22] HOUGH J, HOWARD J D, BROWN S, et al. Strategies for the production of dsRNA biocontrols as alternatives to chemical pesticides [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 980592.
- [23] GUAN R B, CHU D D, HAN X Y, et al. Advances in the development of microbial double-stranded RNA production systems for application of RNA interference in agricultural pest control[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 753790.
- [24] 陈金芝. 苏云金芽孢杆菌介导的小菜蛾精氨酸激酶基因的RNA干扰[D]. 福州: 福建农林大学, 2014.
CHEN J Z. RNA interference of arginine kinase in *Plutella xylostella* mediated by *Bacillus thuringiensis*[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2014. (in Chinese)

收稿日期:2023-04-17 编辑:王佳燕