

多种鉴定方法对金黄色葡萄球菌的应用和比较

刘晓瑜

(安溪县疾病预防控制中心 福建安溪 362400)

【摘要】目的 分析和比较多种方法对金黄色葡萄球菌的鉴定能力,对比各鉴定方法的特点。方法 同时采用国家标准法、VITEK 2 compact生化鉴定系统、MALDI Biotyper质谱检测系统等3种方法对某食品中分离出的典型菌落进行鉴定。结果 3种鉴定方法均能检测出金黄色葡萄球菌,检测正确率不存在差异。结论 相比国家标准法和VITEK 2 compact生化鉴定系统,MALDI Biotyper质谱检测系统的鉴定软件分析更加快速,耗时间更短;另外图谱形式和评分值的体现更为直观。MALDI Biotyper质谱检测系统对金黄色葡萄球菌鉴定耗时间短,主观因素影响少,具有快速鉴定的应用价值,在通量和效率方面表现出较大的优势,可以在各级实验室进行推广使用。

【关键词】金黄色葡萄球菌; MALDI Biotyper; VITEK 2 compact

Application and comparison of multiple identification methods for *S. aureus*

Xiao-yu liu

Anxi County Center for Disease Control and Prevention, Fujian Anxi 362400

[Abstract] Objective To analyze and compare the ability of various methods to identify *Staphylococcus aureus* and compare the characteristics of each method. Methods National standard method, VITEK 2 compact biochemical identification system and MALDI Biotyper mass spectrometry detection system were used to identify the typical colonies isolated from a food. Results All three identification methods detected *Staphylococcus aureus* and there was no difference in detection accuracy. Conclusion Compared with the national standard method and VITEK 2 compact biochemical identification system, the MALDI Biotyper MS identification software analysis is faster and less time consuming; and the atlas form and score value are more intuitive. MALDI Biotyper Mass spectrometry detection system takes short time to identify *S. aureus*, has less influence on subjective factors, has the application value of rapid identification, and shows great advantages in throughput and efficiency, which can be popularized and used in laboratories at all levels.

[Key words] *Staphylococcus aureus*; MALDI Biotyper; VITEK 2 compact

金黄色葡萄球菌是分布于自然界中的一种革兰阳性条件致病菌,对高温、干燥等环境条件均存在较强的抵抗力,不仅会产生肠毒素和血浆凝固酶,还会引起食物中毒^[1],目前实验室对食品金黄色葡萄球菌检测的最常用方法有国家标准法、VITEK 2 compact生化鉴定、PCR法等^[2]。VITEK 2 Compact系统自动化功能好,稳定性高,鉴定结果准确性高,但对菌悬液的制备要求高,需尽量使用新鲜培养的菌株,否则由于传代次数多引起菌株的生化特性改变而导致误判或可信度降低^[3]。MALDI Biotyper质谱检测系统是基于微生物特征蛋白指纹图谱上进行鉴定分析,采用 Biotyper 软件对未知微生物的特征性MALDI指纹图谱进行分析处理,并和数据库中已知微生物的标准指纹图谱匹配,从而快速完成对未知微生物的鉴定。本研究对分离出的典型菌落分别应用国家标准方法、VITEK 2 Compact系统鉴定、MALDI Biotyper

质谱检测系统系统等3种方法进行鉴定,并比较研究这3种方法的鉴定结果和时长,以为日常金黄色葡萄球菌快速检测方法选择上提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品处理与增菌

称取 25g 样品至无菌均质袋中,加入灭菌的 225mL 7.5% 氯化钠肉汤,均质拍打 1~2 分钟,震荡混匀并于 36℃ 培养 18h。

1.2 仪器与试剂

MALDI Biotyper 全自动快速微生物质谱鉴定系统(简称 MALDI Biotyper 质谱检测系统)、VITEK 2 compact 全自动微生物分析系统(生物梅里埃)(简称 VITEK 2 compact 生化鉴

定系统)、Thermo 3111 型 CO₂ 培养箱。血平板(批号 N1023Y)、BP 平板(批号 N1036Y)、金黄色葡萄球菌标准菌株(批号 ATCC6538)均购自广东环凯、甲酸(批号 64-18-6)、无水乙醇(批号 64-17-5)、乙腈(批号 75-05-8)、三氟乙酸(批号 76-05-1)均购自上海易恩化学技术有限公司, α -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)基质(批号 7020120105)、Bacterial Test Standard(BTS)标准品(批号 0000419794)购自 Bruker, GP 卡(生物梅里埃)。

1.3 方法

1.3.1 国家标准方法鉴定

根据 GB 4789.10-2016 中的金黄色葡萄球菌定性检验程序将增菌后的样品溶液在 Baird-Parker 平板上划线接种, 36 °C 培养 24h, 并划线接种于血平板中, 36 °C 培养 18h。

1.3.2 VITEK 2 Compact 生化鉴定系统检测

无菌挑取血平板上适量的典型菌落, 用无菌生理盐水调整菌液浓度至 0.5 ~ 0.6 麦氏单位, 使用 GP 卡, 操作程序严格遵照相关标准要求进行, 利用 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统进行鉴定。

1.3.3 MALDI Biotyper 质谱检测系统检测

对血平板上的典型单个菌落用无菌牙签少量挑取, 并在 MALDI 靶板上均匀涂抹开, 然后放置室温下自然干燥, 加入 1 μ L 70% 甲酸水溶液到单菌落涂层上, 待自然干燥后, 将基质溶液 1mL 加入, 依然需要将样本放置到自然干燥, 最后质谱仪进行检测。

布鲁克 MALDI Biotyper 质谱检测系统的鉴定报告以鉴定分值与鉴定结果的形式体现, 鉴定分值的判定标准为: 2.00 ~ 3.00 为高置信度鉴定结果, 1.70 ~ 1.99 为低置信度鉴定结果, 0.00 ~ 1.69 为无生无生物体鉴定结果。

2 结果

2.1 国家标准法分离结果

增菌后的培养物在 Baird-Parker 平板上菌落颜色为灰黑色、周围有不透明圈且表面光滑湿润样(图 1), 对典型菌落进行革兰氏染液染色, 在显微镜下可见呈葡萄状样的革兰氏阳性球菌。血琼脂平板上的菌落为圆形, 较大, 有透明溶血圈(图 2)。挑取血平板典型菌落接种于 BHI 肉汤, 36

°C 培养 18h, 在含冻干兔血浆的西林瓶中加入 0.3mL 培养物, 每半个小时观察一次, 培养 2h, 结果液体呈凝固状形态, 因此判定所挑取的典型菌落为金黄色葡萄球菌。

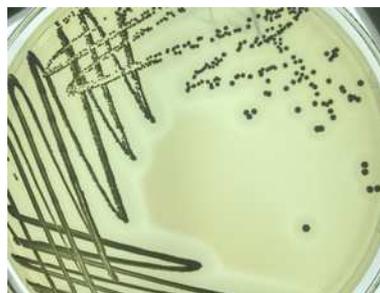


图 1 金黄色葡萄球菌菌落(Baird-Parker 平板)



图 2 金黄色葡萄球菌菌落(血琼脂平板)

2.2 MALDI Biotyper 质谱检测系统结果

由表 1 可知, MALDI Biotyper 系统对金黄色葡萄球菌标准菌株评分值均大于 2.00, 金黄色葡萄球菌标准菌株的特征性 MALDI 指纹图谱与 Biotyper 软件数据库特征序列匹配度高(见图 3), 分离菌的特征性 MALDI 指纹图谱与 Biotyper 软件数据库特征序列匹配度高(见图 4), 基于金黄色葡萄球菌标准菌株的检测结果可知 MALDI Biotyper 系统评分鉴定方法是可信的, 能达到种水平鉴定的只有金黄色葡萄球菌, 再结合此前的分离培养特性, 即该分离菌为金黄色葡萄球菌。

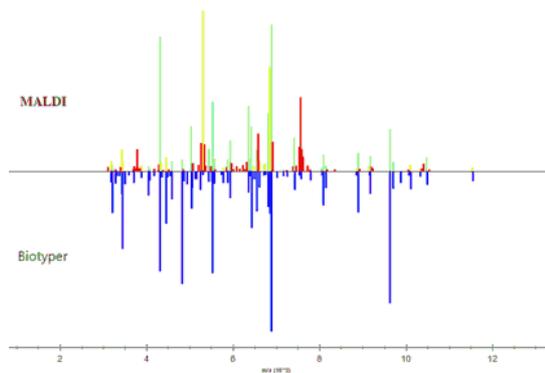


图 3 金黄色葡萄球菌标准菌株特征指纹谱对比

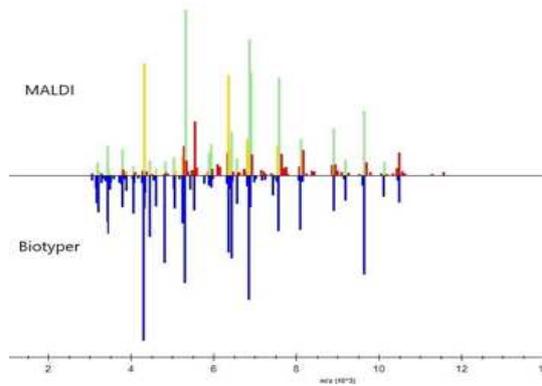


图4 分离菌特征指纹谱对比

2.3 三种鉴定方法特点比较

MALDI Biotyper 质谱检测系统鉴定所用时间、读取方式、仪器辅助情况、成本均优于国家标准法和 VITEK 2 compact 生化鉴定系统。如表 2 所示。

表2 三种鉴定方法特点比较

组别	所用时间	辅助仪器需要情况	检查结果读取方式	成本	准确率 (%)
MALDI Biotyper质谱检测系统	5 ~ 8min	需要	仪器显示	低	100
VITEK 2 Compact生化鉴定系统	4 ~ 5h	需要	仪器显示	低	100
国家标准方法	48 ~ 72h	不需要	肉眼判读	高	100

3 讨论

国家标准方法具有重复性、可溯源、适用性强等优点，但对人员操作和能力要求高，检测时间长，其对金黄色葡萄球菌的确证依据是通过血平板上完全透明溶血圈的典型菌落进行染色镜检和血浆凝固酶试验，但检测耗费的时间超过48h。VITEK 2 compact鉴定金黄色葡萄球菌过程中由于是仪器进行判读，其中人为的干扰相对小。VITEK 2 compact系统可对20多个样品进行同时检测，但是需要耗费时间至少4~5h^[5]。在本研究中，MALDI Biotyper质谱检测系统需要的样品量少，通过对金黄色葡萄球菌的特征性蛋白图谱分析和数据库比对，只需几分钟就能够快速产生鉴定结果。其次，

表1 MALDI Biotyper 质谱检测系统对分离菌和金黄色葡萄球菌标准菌株的评分值

重复次数	分离菌	标准菌株
1	2.10	2.25
2	2.10	2.19
3	2.08	2.18
4	2.07	2.18
5	2.06	2.17
6	2.03	2.16
7	2.01	2.19
8	2.01	2.18
9	2.00	2.18
10	2.00	2.19

MALDI Biotyper质谱检测系统一次可检测90多个样品，还可以依据自身所需进行数据库的创建，同时利用Biotyper软件的应用编译微生物条目，以此提高微生物鉴定方法特异性，同时保证其鉴定的快速性。通过对各种复杂的生物信息特征蛋白指纹图谱比较和数据统计，用户可以依据此特点进行自主组织、创建以及修改光谱数据库进一步优化微生物的分类过程。

综上所述，相比国家标准法和 VITEK 2 compact 生化鉴定系统，MALDI Biotyper 质谱检测系统对金黄色葡萄球菌鉴定耗费时间短，主观因素影响少，具有快速鉴定的应用价值，在通量和效率方面表现出较大的优势，可以在各级实验室进行推广使用。

参考文献:

- [1]李秀珍,李智慧,刘风琴等.4种微生物鉴定方法对药品中金黄色葡萄球菌的鉴定与分析[J].首都食品与医药,2023,30(7):166-168.
- [2]岳国萍,刘新,崔海洋,等.两种方法检测食品中金黄色葡萄球菌的结果分析[J].首都公共卫生杂志,2009,3(2):46-48.
- [3]孟令缘,牛沁雅,廉鲁昕等.基于16S rDNA序列、MALDI-TOF-MS和VITEK的沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的鉴定[J].中国食品学报,2021,21(10):197-205.
- [4]JACKSON O L. MALDI -TOF mass spectrometry of bacteria [J]. Mass Spectrometry Reviews, 2001, 20 (4): 172-194.
- [5]王平珍,郝会青,何江.痰标本中分离鉴定金黄色葡萄球菌的临床实验研究[J].中国卫生检验杂志,2021,31(1):42-49.