

So sánh kết quả định danh vi khuẩn và nấm bằng hệ thống Maldi-Tof Vitek MS và Vitek 2 compact

Identification of bacteria and yeast by Maldi-Tof Vitek MS and Titek 2 Compact

Lê Thị Huyền Trang, Trịnh Thu Hà, Nguyễn Thảo Ly
Bùi Thanh Thuyết, Bùi Tiến Sỹ, Nguyễn Thị Kim Phương

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: So sánh kết quả định danh vi khuẩn và nấm giữa 2 hệ thống Maldi-Tof Vitek MS và Vitek 2 Compact. **Đối tượng và phương pháp:** 260 khuẩn lạc phân lập từ các mẫu bệnh phẩm tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 từ tháng 9/2019 đến tháng 11/2019 được định danh đồng thời bằng Maldi-Tof Vitek MS và Vitek 2. **Kết quả:** 260 chủng được định danh bằng 2 phương pháp bao gồm 241 chủng vi khuẩn và 19 chủng nấm, đại diện cho 40 chi khác nhau, có 6 chủng không định danh được. Những vi khuẩn này được phân lập thường xuyên từ các bệnh phẩm lâm sàng như *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter*... Trong số đó kết quả định danh khớp cả 2 phương pháp là 234 chủng chiếm 90% (trong đó có 30 loài vi khuẩn và nấm), có 19 chủng được định danh ở mức độ giống bởi cả 2 phương pháp nhưng khác nhau ở mức độ loài chiếm 7,31% và đặc biệt có 7 chủng (2,69%) có kết quả định danh khác nhau về giống vi khuẩn. Thời gian định danh trung bình của Vitek 2 compact đối với các chủng vi khuẩn Gram âm, vi khuẩn Gram dương và nấm tương ứng là 306 phút, 308 phút và 1079 phút; trong khi đó giá trị này của Maldi-Top Vitek MS là 1 đến 30 phút đối với tất cả các mẫu bệnh. **Kết luận:** Định danh vi khuẩn và nấm bằng hệ thống Maldi-Tof Vitek MS cho kết quả nhanh và chính xác. Nghiên cứu của chúng tôi còn hạn chế là chưa tiến hành giải trình tự 16S của các chủng có sự khác biệt giữa 2 phương pháp để khẳng định kết quả định danh.

Từ khóa: Maldi-Tof Vitek MS, Vitek 2 compact, định danh vi khuẩn, nấm.

Summary

Objective: To compare the identification of bacteria and yeast by Maldi-Tof Vitek and Vitek 2 compact systems. **Subject and method:** 260 colonies isolated from clinical samples at 108 Military Central Hospital from September, 2019 to October, 2019 were identified by using two Maldi-Top Vitek MS and Vitek 2 systems. **Result:** 260 isolates were successfully identified by both methods, include 241 bacteria strains and 19 yeast strains belonging into 40 genus. Common bacteria strains isolated *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter*... Of those, 253 strains were (97.31%) completely match in identification by both methods in genus level and 7.31% strains were differently identified in species level. We found that 7 isolates (2.69%) were inaccordantly identified by both methods in genus level. The average time for identification of negative bacteria, positive bacteria, yeast by Vitek 2 compact systems were 306, 308, and 1079 minutes, respectively. Meanwhile Maldi-Tof Vitek MS showed identification after several

Ngày nhận bài: 29/9/2020, ngày chấp nhận đăng: 02/11/2020

Người phản hồi: Lê Thị Huyền Trang, Email: huyentranqt108@gmail.com - Bệnh viện TWQĐ 108

minutes for bacteria as well as yeast. *Conclusion:* Maldi-Tof Vitek MS rapidly and accurately identifies bacteria and yeast. The limitation of this study is lack of the 16S sequencing method as the gold standard method for confirming bacteria and yeast strains which are unmatched in identification by Maldi-Tof Vitek MS and Vitek 2 compact systems.

Keywords: Bacteria, yeast, identification, Maldi-Tof Vitek MS, Vitek 2 compact.

1. Đặt vấn đề

Theo truyền thống, việc định danh vi khuẩn và nấm chủ yếu dựa trên đặc điểm về kiểu hình, bao gồm nuôi cấy, đặc điểm khuẩn lạc, nhuộm Gram và các phản ứng sinh học [1]. Tất cả các phương pháp trên đều có độ chính xác cao, thường mất từ 1 ngày hoặc dài hơn để hoàn thiện một quy trình định danh. Phương pháp sinh học phân tử như Realtime PCR hoặc giải trình tự gen, phân tích microarray là phương pháp nhanh cho định danh vi khuẩn và nấm nhưng giá thành đắt và đòi hỏi kỹ thuật cao. Vì vậy, phương pháp sinh học phân tử không được sử dụng thường xuyên để định danh vi khuẩn. Công nghệ khối phổ protein Maldi-Tof MS đã được nghiên cứu và ứng dụng trong định danh mầm bệnh vi sinh. Đây là một kỹ thuật định danh nhanh và dễ dàng cung cấp kết quả kịp thời cho các bác sĩ lâm sàng, đặc biệt trong trường hợp bệnh nhân nguy kịch bị bệnh truyền nhiễm và điều trị can thiệp là cần thiết khẩn cấp. Công nghệ khối phổ thu thập các phổ protein được phân tích trong tế bào vi khuẩn [2] và so sánh với nguồn dữ liệu đã được thiết lập để cho kết quả định danh nhanh hơn. Ứng dụng sớm nhất kỹ thuật này cho việc định danh vi khuẩn có từ năm 1975 [3], tuy nhiên công bố đầu tiên được thực hiện năm 1996 [4]. Các nghiên cứu ứng dụng Maldi Tof để định danh mầm bệnh vi sinh tiến bộ dần dần trong những năm đầu thế kỷ XXI và được sử dụng trong xét nghiệm thường quy tại các bệnh viện [5]. Cho đến nay nghiên cứu so sánh định danh mầm bệnh vi sinh bằng 2 phương pháp Maldi-Tof MS và Vitek 2 trong nước vẫn còn ít.

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Gồm 260 chủng bao gồm 241 chủng vi khuẩn và 19 chủng nấm, đại diện cho 40 chi khác nhau được chọn để phân tích. Những vi khuẩn này được phân lập

thường xuyên từ các bệnh phẩm lâm sàng như *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter*... gây nhiễm trùng phổi và *Enterobacteriaceae* gây nhiễm trùng đường niệu và đường máu.

2.2. Phương pháp

Định danh bằng Vitek 2 Compact (Vitek 2):

Các thẻ định danh GP, GN, YST sử dụng để định danh các chủng vi khuẩn và nấm men. Kết quả định danh được ghi nhận khi mức độ phù hợp lớn hơn 93% bởi Vitek 2 Compact (bioMérieux) (5). Kiểm soát chất lượng xét nghiệm được tiến hành bởi các chủng chuẩn: *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923.

Định danh bằng Maldi-Tof Vitek MS (Vitek MS) bằng cách sử dụng hệ thống Vitek MS (bioMérieux):

Chủng chuẩn *E. coli* ATCC 8739 được sử dụng để làm nội chuẩn cho định danh và phải được ủ trong 18 - 24h/37°C $\pm$ 2 trên thạch máu.

Dàn chủng chuẩn *E. coli* ATCC 8739 và nhỏ dung dịch Vitek - MS - CHCA matrix trước khi nhỏ mẫu.

Sử dụng que cấy định lượng 1μL lấy khuẩn lạc phù hợp cho mẫu vào giữa của mỗi vị trí, lấy ăng cấy 1μL vô trùng dàn một lớp mỏng trên giếng, sau đó bỏ que cấy đã sử dụng, thêm 1μL chất nền Vitek - MS - CHCA vào giữa giếng, để khô hoàn toàn cho đến khi mẫu và chất nền tạo thành tinh thể trên giếng lặp lại, lặp lại ..., đưa thẻ với tất cả các mẫu đã chuẩn bị vào máy Vitek MS, chạy để thu được khối phổ protein tế bào vi khuẩn, chủ yếu bao gồm protein ribosom. Sử dụng ăng cấy mới và đầu côn mới cho mỗi mẫu.

Trong trường hợp nấm men, nhỏ 0,5μL Vitek - MS - FA vào mỗi mẫu trên mỗi giếng trên slide và để khô trước khi thêm 1μL chất nền Vitek - MS - CHCA. Cuối cùng khối phổ thu được cho mỗi mẫu so sánh với khối phổ đã biết trong dữ liệu.

Nhận định và phân loại kết quả: Kết quả định danh đồng thuận khi cả hai phương pháp cho cùng 1 vi khuẩn trên 1 mẫu định danh. Kết quả không đồng thuận khi có sự khác biệt về kết quả định danh. Không đồng thuận ở mức độ chi là kết quả định danh ở cả 2 phương pháp cho cùng loài vi khuẩn nhưng khác chi (Ví dụ: *Aeromonas sobria* và *Aeromonas jandaei*), và không đồng thuận ở mức độ

loài là kết quả định danh bằng 2 phương pháp cho kết quả 2 loài vi khuẩn trên 1 mẫu định danh.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý qua tỷ lệ phần trăm và so sánh 2 tỷ lệ trên phần mềm Excel.

3. Kết quả

Bảng 1. Đặc điểm phân loại các chủng được định danh

TT	Nhóm	Số lượng	Tỷ lệ %
1	Vi khuẩn Gram âm	169	65,0
2	Vi khuẩn Gram dương	72	27,7
3	Nấm	19	7,3
Tổng		260	100,0

Nhận xét: Có 260 chủng được định danh đồng thời bởi cả 2 phương pháp, trong đó vi khuẩn gram âm chiếm ưu thế với 65%, vi khuẩn gram dương 27,7% và 7,3% số chủng là nấm men.

Bảng 2. Kết quả định danh đồng thuận bằng 2 phương pháp

STT	Vi khuẩn	Số chủng	Tỷ lệ %
1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	45	19,2
2	<i>Escherichia coli</i>	32	13,7
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29	12,4
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27	11,5
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	26	11,1
6	<i>Candida albicans</i>	10	4,3
7	<i>Streptococcus mitis/Streptococcus oralis</i>	10	4,3
8	<i>Candida tropicalis</i>	8	3,4
9	<i>Klebsiella aerogenes</i>	7	3,0
10	<i>Enterococcus faecalis</i>	6	2,6
11	<i>Enterococcus faecium</i>	4	1,7
12	<i>Proteus mirabilis</i>	4	1,7
13	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	4	1,7
14	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3	1,3
15	<i>Aeromonas hydrophila/punctata(caviae)</i>	2	0,9
16	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	0,9
17	<i>Streptococcus anginosus</i>	2	0,9
18	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	0,4
19	<i>Citrobacter koseri</i>	1	0,4

Bảng 2. Kết quả định danh đồng thuận bằng 2 phương pháp (Tiếp theo)

STT	Vi khuẩn	Số chủng	Tỷ lệ %
20	<i>Enterobacter hormaechei</i>	1	0,4
21	<i>Providencia rettgeri</i>	1	0,4
22	<i>Rhizobium radiobacter</i>	1	0,4
23	<i>Serratia marcescens</i>	1	0,4
24	<i>Staphylococcus capitis</i>	1	0,4
25	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0,4
26	<i>Staphylococcus lenus</i>	1	0,4
27	<i>Staphylococcus warneri</i>	1	0,4
28	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0,4
29	<i>Streptococcus gallolyticus ssp pasteurianus</i>	1	0,4
30	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	0,4
	Tổng	234	100,0

Nhận xét: Trong tổng số 260 chủng thu thập từ các mẫu bệnh phẩm lâm sàng, được định danh, có 234 chủng cho kết quả đồng thuận bằng cả 2 phương pháp với tỷ lệ 90%. Trong đó có 153 chủng vi khuẩn gram âm (90,5%), 63 chủng vi khuẩn gram âm (87,5%) và 18 chủng nấm men (94,7%)

Bảng 3. Kết quả định danh không đồng thuận

TT	Mã chủng	Kết quả định danh bằng Vitek 2	Kết quả định danh bằng Vitek MS	Mức độ không đồng thuận
1	1912198	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>Achromobacter denitrificans</i>	Chi
2	1913068	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Aeromonas jandaei</i>	Chi
3	1912072	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Chi
4	1913346	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia multivorans</i>	Chi
5	1912125	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter braakii</i>	Chi
6	1913134	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Chi
7	1913167	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Chi
8	1913293	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Chi
9	1912219	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	Chi
10	1912453	<i>Streptococcus pseudoporcinus</i>	<i>Streptococcus mitis/Streptococcus oralis</i>	Chi
11	1912831	<i>Streptococcus pseudoporcinus</i>	<i>Streptococcus mitis/Streptococcus oralis</i>	Chi
12	1912514	<i>Streptococcus mitis/Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Chi
13	1914734	<i>Candida ciferrii</i>	<i>Candida albicans</i>	Chi
14	2000427	<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Chi
15	1913590	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Chi
16	1914228	<i>Escherichia coli O157</i>	<i>Escherichia coli</i>	Chi

Bảng 3. Kết quả định danh không đồng thuận (Tiếp theo)

TT	Mã chủng	Kết quả định danh bằng Vitek 2	Kết quả định danh bằng Vitek MS	Mức độ không đồng thuận
17	2000637	<i>Staphylococcus hominis ssp hominis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Chi
18	2000704	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus kloosii</i>	Chi
19	2000135	<i>Streptococcus mitis/Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Chi
20	2000427	<i>Bordetella hinzii</i>	<i>Achromobacter denitrificans</i>	Loài
21	1914909	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Loài
22	2000628	<i>Kocuria kristinae</i>	<i>Corynebacterium striatum</i>	Loài
23	2000222	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Corynebacterium striatum</i>	Loài
24	19M5705	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Corynebacterium striatum</i>	Loài
25	1914333	<i>Shigella group</i>	<i>Morganella morganii</i>	Loài
26	2000146	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Neisseria flava/perflava/subflava</i>	Loài

Nhận xét: 26 chủng có kết quả định danh không đồng thuận giữa 2 phương pháp chiếm tỷ lệ 10% số chủng nghiên cứu, trong đó có 10 chủng vi khuẩn gram âm, 15 chủng vi khuẩn gram dương và 1 chủng nấm. Có 2 mức độ không đồng thuận là không đồng thuận ở mức độ chi, tức là kết quả định danh giống về loài và khác về chi với 19 chủng chiếm 7,31% và chỉ có 7 chủng (2,69%) có kết quả định danh khác ở mức độ loài, trong đó 2 chủng vi khuẩn Gram dương và 5 chủng vi khuẩn Gram âm với tỷ lệ tương ứng là 2,78% và 2,95% trong cùng nhóm vi khuẩn. Như vậy xét về mức độ loài giữa có 253 chủng được định danh chiếm tỷ lệ 97,31% có kết quả đồng thuận 2 phương pháp.

Bảng 4. Thời gian định danh

TT	Mầm bệnh	Thời gian định danh trung bình (phút) Vitek 2	Thời gian định danh trung bình (phút) Vitek MS
1.	Gram âm	306	5 - 7
2.	Gram dương	308	5 - 7
3.	Gram dương	1079	5 - 7

Nhận xét: Thời gian định danh trung bình của Vitek 2 compact đối với các chủng vi khuẩn Gram âm, vi khuẩn Gram dương và nấm tương ứng là 306 phút, 308 phút và 1079 phút. Trong khi đó, thời gian định danh trung bình của Vitek MS đối với các chủng vi khuẩn Gram âm, vi khuẩn Gram dương trong vòng vài phút.

4. Bàn luận

Maldi-Tof MS là một phương pháp hiệu quả nhanh chóng và tương đối rẻ tiền để định danh vi

sinh vật gây bệnh bao gồm cả vi khuẩn và nấm. Đây là phương pháp sử dụng khối phổ kỹ thuật ion hóa theo cơ chế giải hấp phụ sử dụng nguồn laser với sự trợ giúp của chất nền, định danh các loài vi khuẩn, nấm bằng cách ghi nhận các dải quang phổ và phân tích các dải quang phổ với cơ sở dữ liệu của VITEK® MS, cho phép phát hiện các protein hòa tan có độ phong phú cao, bao gồm ribosome và các protein cấu trúc khác trực tiếp từ các tế bào vi khuẩn, nấm còn nguyên vẹn nên độ chính xác cao và định danh được đến mức độ chi và loài. Từ tháng

9 năm 2019, tại Bệnh viện TWQĐ 108 hệ thống Maldi-Tof Vitek MS đã được ứng dụng trong xét nghiệm thường quy định danh vi khuẩn. Định danh bằng Vitek MS tương thích rộng với nhiều môi trường và điều kiện nuôi cấy, và là phương tiện nhanh nhất để định danh các mẫu nuôi cấy dương tính [1]. Hơn nữa Vitek MS có triển vọng ứng dụng rộng hơn trong lĩnh vực thử nghiệm kháng thuốc [2], [3] rút ngắn thời gian để xác định mầm bệnh và cung cấp kết quả nhanh hơn cho lâm sàng, là vấn đề quan trọng cần được giải quyết cho vi sinh phòng xét nghiệm. Dựa trên dữ liệu của chúng tôi, các bác sĩ lâm sàng có kinh nghiệm có thể điều trị bệnh nhân nhiễm trùng nghiêm trọng, điều trị kháng sinh thích hợp xác định hiệu quả và kịp thời mầm bệnh vi khuẩn, vi nấm. Giúp bác sĩ lâm sàng rút ngắn thời gian điều trị cho bệnh nhân và giảm tỉ lệ tử vong, giảm chi phí nằm viện cho bệnh nhân.

Trong nghiên cứu này 260 chủng vi khuẩn, nấm gây bệnh thường gặp được định danh đồng thời bằng Vitek MS và Vitek 2, trong đó có 241 chủng vi khuẩn và 19 chủng nấm, đại diện cho 40 chi khác nhau. Kết quả định danh cho thấy 234 chủng (90%) phân lập 19 chi và 30 loài đồng thuận ở cả 2 phương pháp ở mức độ chi. Kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu của Lingo Guo và cộng sự, nghiên cứu của Camila Gabriela da Silva và cộng sự, với tỷ lệ đồng thuận ở mức độ chi lần lượt là 92,59% và 92,8% [2], [4]. Kết quả định danh không phù hợp giữa 2 phương pháp đến mức độ chi là 7 (2,69%), không phù hợp đến mức độ loài là 26 (10%) trong tổng số 260 loài định danh được. 97,31% số chủng được định danh đồng thuận ở mức độ loài, kết quả này cũng tương tự như Van Veen và cộng sự với tỷ lệ là 97,1% [5].

Thời gian định danh vi khuẩn Gram âm, Gram dương và nấm men trên hệ thống Vitek 2 lần lượt là 306, 308 và 1079 phút. Trong khi đó, Vitek MS cho kết quả định danh trong vài phút. Kết quả này tương tự như nghiên cứu của Hong-wei Pan và cộng sự thời gian định danh trung bình của các loài vi khuẩn và nấm trên MALDI-TOF là < 15 phút [6]. Nghiên cứu của Charnot và cộng sự cho thấy Maldi-Tof MS giúp

giảm 10,52 giờ thời gian trả kết quả định danh cho bệnh nhân [7].

5. Kết luận

So với phương pháp định danh vi khuẩn bằng hệ thống Vitex 2 compact thì MALDI-TOF Vitek MS cho kết quả định danh vi khuẩn và nấm nhanh và chính xác. Rút ngắn thời gian định danh chỉ còn vài phút so với 6 giờ - 16 giờ đối với vi khuẩn và nấm bằng hệ thống Vitek 2.

Tài liệu tham khảo

1. Drancourt M (2010) *Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: A review*. Clinical Microbiology and Infection 16(11): 1620-1625.
2. Burckhardt I and Zimmermann S (2011) *Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours*. Journal of clinical microbiology 49(9): 3321-3324.
3. Hrabák J et al (2011) *Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*. Journal of clinical microbiology 49(9): 3222-3227.
4. Guo L, et al (2014) *Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification*. Journal of thoracic disease 6(5): 534-538.
5. van Veen SQ, Claas EC, and Kuijper EJ (2010) *High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories*. J Clin Microbiol 48(3): 900-907.
6. Pan HW et al (2018) *Simple sample preparation method for direct microbial identification and susceptibility testing from positive blood cultures*. Frontiers in microbiology 9: 481-481.
7. Charnot-Katsikas A et al (2014) *Prospective evaluation of the VITEK MS for the routine identification of bacteria and yeast in the clinical microbiology laboratory: Assessment of accuracy of identification and turnaround time*. J Med Microbiol 63(2): 235-241.