

基于高场不对称波形离子迁移谱技术的细菌培养液检测

陆彦邑, 毕玉田, 尹军, 何庆华

第三军医大学大坪医院野战外科研究所/创伤烧伤复合伤国家重点实验室, 重庆 400042

【摘要】目的:利用高场不对称波形离子迁移谱(FAIMS)技术检测并识别常见伤口感染细菌。**方法:**在合适的实验条件下,用FAIMS分析仪检测大肠杆菌(ECO)、金黄色葡萄球菌(SAU)、铜绿假单胞菌(PAE)的TH肉汤培养液及纯TH肉汤培养液4种样品,得到其离子迁移谱图。分析谱图形状,提取峰值点,通过对比分析确定3种细菌TH培养液的特征离子峰。**结果:**ECO与SAU均有有别于另外3种样品的稳定特征离子峰,特征峰可用场强、补偿电压、离子电流值3个参量确定。PAE出现两个特征峰,其中一个不稳定出现,但依然可凭借第二个特征峰进行辨别。**结论:**FAIMS技术可对ECO、SAU、PAE这3种常见细菌的TH肉汤细菌培养液进行甄别,为伤口感染的快速检测提供一定的可行性。

【关键词】高场不对称波形离子迁移谱;细菌检测;特征离子峰;大肠杆菌;金黄色葡萄球菌;铜绿假单胞菌

【中图分类号】Q93-331

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2017)03-0297-05

Detection of bacterial culture broth based on high-field asymmetric ion mobility spectrometry

LU Yanyi, BI Yutian, YIN Jun, HE Qinghua

State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Abstract: Objective To detect and identify common wound-infecting bacterial species using high-field asymmetric ion mobility spectrometry (FAIMS). **Methods** Under optimal experimental conditions, *escherichia coli* (ECO), *staphylococcus aureus* (SAU), *pseudomonas aeruginosa* (PAE) cultured in thioglycolate (TH) broth and bare TH broth were tested by FAIMS analyzer, and their ion mobility spectra were obtained. The spectra shape was analyzed and the peaks were extracted. The characteristic ion peaks of the three kinds of bacteria in TH broth were determined by comparative analysis. **Results** Both ECO and SAU showed stable characteristic ion peaks that differentiate them from the other three samples. The characteristic peaks can be defined by dispersion field, compensation voltage and ion current. PAE showed two characteristic ion peaks, with an unstable one and the other which was stable enough for the identification of the bacterium. **Conclusion** FAIMS can differentiate ECO, SAU and PAE cultured in TH broth, which are the three most common kinds of bacteria found in infected wound, suggesting a new method for the rapid identification of wound-infecting bacteria.

Keywords: high-field asymmetric ion mobility spectrometry; bacterium detection; characteristic ion peak; *escherichia coli*; *staphylococcus aureus*; *pseudomonas aeruginosa*

前言

高场不对称波形离子迁移谱(FAIMS)技术是一种近年发展起来的气相离子分离技术,其利用不同离子的迁移率在高低电场下的差值实现离子的分离^[1]。

相比于传统离子迁移谱技术利用离子迁移时间进行分离,FAIMS技术具有快速检测、灵敏度高、可重复性等特点,已经在危险品与毒品分析^[2-3]、化学检测^[4-6]、环境检测^[7-8]、气味风味检测^[9-10]及生物医药^[11]等诸多领域得到广泛应用。医学上已有报道详细阐述了其应用,包括肠胃疾病^[12-15]、腹部疾病^[16]、气道疾病、艰难梭菌、肝性脑病^[17]的检测与分析。可以看出FAIMS在医学领域还有更广阔的发展前景,但国内在此方面的研究较少。

伤口感染是临床工作中常见症状和术后并发症,严重时威胁患者的生命。且现有的细菌感染

【收稿日期】2016-10-22

【基金项目】国家国际科技合作专项(2014DFA31560);重庆市科技研发基地建设计划(国际科技合作)(cstc2013gjh10003)

【作者简介】陆彦邑,女,硕士,研究实习员,研究方向:生物医学信号处理,E-mail: 90911xbh@163.com

【通信作者】何庆华,女,博士,副研究员,研究方向:生物医学信号处理,E-mail: qinghuahe@126.com

大多是采用生物学方法进行检测,检测周期长,在一定程度上会延误临床治疗。早期对伤口感染的快速检测与治疗,对疾病的治疗具有极大的意义。因此,本文将FAIMS应用于伤口感染常见细菌的检测,得到了3种常见细菌的离子迁移谱图,并研究了其指纹图谱,获得了各自的特征离子峰。本研究为伤口细菌感染的快速检测提供一个新的可能性。

1 实验部分

1.1 FAIMS 技术

本文采用英国 Owlstone 公司的 Lonestar 作为 FAIMS 分析仪,电离源为⁶³Ni,射频电压最高可达 75 kV/cm,直流补偿电压扫描范围为-6~+6 V;进样系统为 Atlas 进样模块,装置结构如图 1 所示;载气使用零级空气发生器。

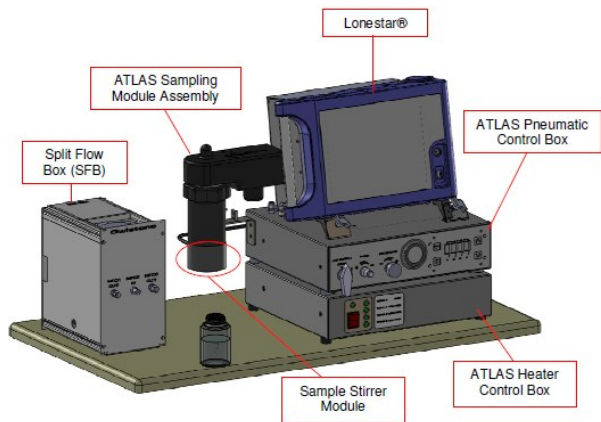


图 1 Lonestar 系统装置图
Fig.1 Set-up diagram of Lonestar system

FAIMS 核心部件原理如图 2 所示。空气中,离子在电场中会沿电场方向运动,运动速度 v 与电场强度 E 成正比,该比例因子即迁移率 K :

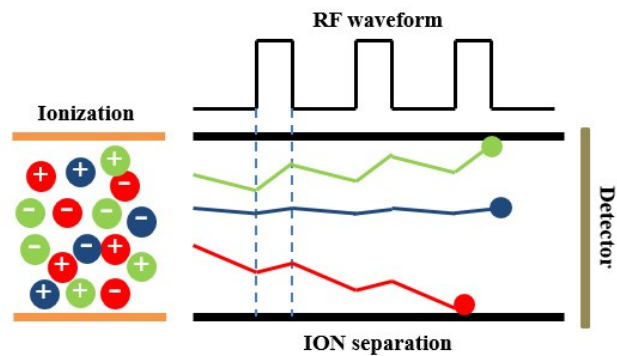


图 2 FAIMS 技术原理图
Fig.2 Schematic diagram of high-field asymmetric ion mobility spectrometry (FAIMS)

$$v=K \cdot E$$

(1)

当离子进入电极沟道后,射频电压在高电场和低电场下交替振荡。离子迁移率在高低电场下的差别决定了离子在沟道内的运动轨迹,不同种类的离子沿着不同轨迹运动。此时,在射频电场上施加一个横向的直流补偿电压,扫描范围为-6~+6 V。只有特定的离子团在特定的补偿电压下才能通过电极沟道到达前方的检测极板,实现对该种离子的检测。

气态的样品通过载气引入到离化区,样品分子在此被离化源电离,形成正负离子。离子团进入施加有与离子气流运动方向垂直的射频波信号的电极沟道,在高低电场和补偿电压共同作用下,检测极板同时对能到达极板的正离子和负离子计数,并以电流信号输出。射频电场峰(高)到峰(低)电压称为场强,根据式(1),改变场强大小,会改变离子运动速度,从而改变运动轨迹。因此,在一个场强下施加补偿电压扫描一次,然后逐步增加场强大小继续扫描,最终可得到样品的离子迁移谱图。

1.2 实验材料及方法

实验样品为 TH 肉汤培养液(巯基乙酸酯培养基)转种的 3 种细菌培养液:大肠杆菌(ECO)(ATCC25922)、金黄色葡萄球菌(SAU)(ATCC25923)、铜绿假单胞菌(PAE)(ATCC27853),以及未转种的纯 TH 肉汤培养液作为对照,总计 4 种样品。3 种细菌均为同一时间转种、相同时长培养以保持一致性。

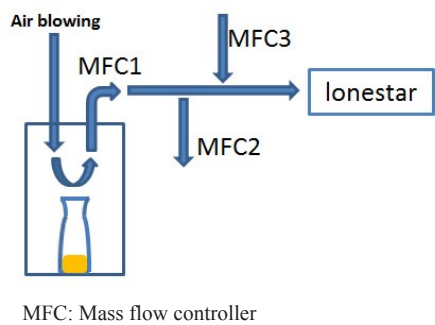
取适量的样品与蒸馏水配置装入 Lonestar 配备的小瓶子中,放入样品室。每组实验中,4 种样品与蒸馏水的配置比例均相同。利用零级空气发生器提供的载气将样品气带入 FAIMS 核心模块进行检测。通过质量流量控制器(MFC)控制气流流速,如图 3 所示。对样品吹气得到样品气,分流掉一部分再与载气混合,MFC1、MFC2、MFC3 分别控制样品气流速、分流气流速、载气流速。

本文的研究主要有 Lonestar 系统的气压、MFC(MFC1、MFC2、MFC3)、场强(DF,以百分比标记,即占最大场强的比例)和样品与蒸馏水配比,这 6 个实验参数需要设置。

2 结果与讨论

2.1 FAIMS 图谱

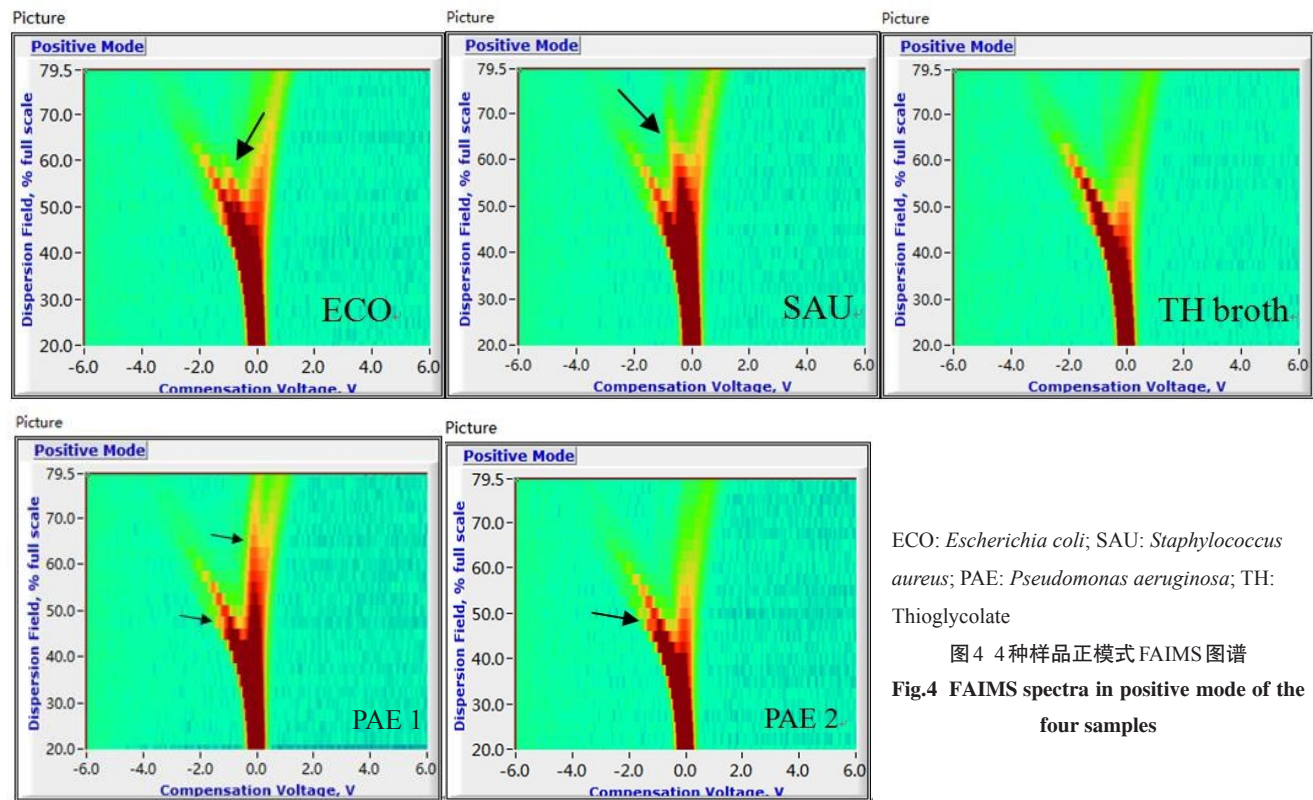
检测极板能同时检测正负离子,因此 lonestar 系统能得出正负模式下的谱图。一个小瓶中的样本可以扫描出多幅谱图,扫完第一幅图场强又从设定的最小值开始扫描第二幅图。根据实验结果,4 种样品



MFC: Mass flow controller
图3 气流路径图
Fig.3 Gas flow path diagram

在正模式下具有区别较为明显的离子迁移谱。

图4为同一实验条件下得出的4种样品的正模式离子迁移谱,横坐标为补偿电压(CV);纵坐标为射频电场场强(DF);颜色代表离子电流值大小(ION),值越大,表示达到检测极板的离子浓度越大。PAE在多次实验中出现了两种谱图,其他样品多次实验均能得到较为稳定的相同谱图,如图4所示。3种细菌相较于培养液均出现了不同的产物离子峰,即其特征离子峰,在图4中用黑色箭头标识。



对于PAE,其右侧的特征峰并不是每次实验都稳定出现。每一次实验取相同的量,PAE在最佳实验条件下一共做过22次实验,其中右侧特征峰共有8次实验出现,而左侧特征峰在22次实验中都在场强为47.5%时出现。因此,无论右侧特征峰出现与否,都能根据左侧特征峰来辨别PAE。但出现右侧产物离子峰的特定条件与有时不出现的原因尚不明确,其影响因素可能是系统条件及样品本身等。

2.2 特征点分析

提取以上5种图谱中峰值点,由于PAE谱图1包含了谱图2的所有产物离子峰,所以以谱图1提取PAE峰值点。可得图5中4种样本的指纹图谱,箭头所示为3种细菌特有的特征离子峰。右侧黑色箭头所示为ECO、SAU、PAE的特征离子峰,3种离子峰在不同

的位置出现,并随着场强增大朝着不同的方向分散。

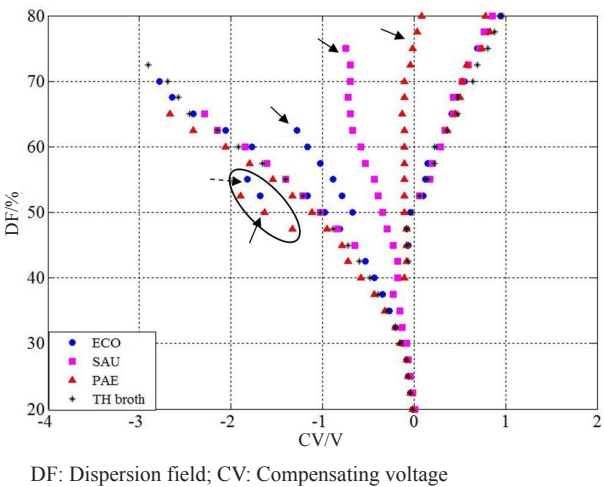


图5 4种样本指纹图谱
Fig.5 Fingerprints of the four samples

自出现特征峰开始,随着场强增大,3种细菌离子电流值减小。表1为右侧3个特征离子峰的3个参量范围,可以看出:ECO特征峰DF范围最小,仅持续6个场强;SAU特征峰出现最早,且ION最高能达到1以上;PAE的CV范围最小(在0 V附近),且ION衰减最慢,当DF为80%还能达0.1以上。也就是说,对于右侧特征离子峰,3种细菌均具有各自的位置与强度,能将3种细菌区分开。

表1 3种细菌右侧特征峰参量范围

Tab.1 Parameter ranges of the right characteristic peaks of the three bacteria

Parameter	DF/%	CV/V	ION (A.U.)
ECO	50.0-62.5	-0.67-1.28	0.390-0.025
SAU	40.0-75.0	-0.18-0.74	1.360-0.066
PAE	50.0-80.0	-0.11-0.08	0.480-0.120

而对于图5左侧,黑色圈内,ECO也出现了与PAE相近的产物离子峰,虚线箭头为ECO、实线箭头为PAE,其DF、CV、ION见表2。虽然位置相近,但依然有明显区别。首先,两种细菌左侧特征离子峰只在52.5%时同时出现,且CV值相差0.210。其次,场强为52.5%时,ION均只有0.050左右,而PAE在场强47.5%时ION能达到0.185,ECO在场强55.0%时ION仅为0.034。以上表明PAE先于ECO出现强度远大于ECO的特征离子峰,依然能根据其辨别两种细菌。值得一提的是,ECO并不是每次都出现左侧离子峰,并且ION值都极小,所以可看作干扰因素。

表2 ECO与PAE左侧产物离子峰参量值

Tab.2 Parameter values of the left ion peaks of ECO and PAE

Parameter	DF/%	CV/V	ION (A.U.)
ECO	52.5	-1.681	0.066
	55.0	-1.821	0.034
PAE	47.5	-1.328	0.185
	50.0	-1.633	0.090
	52.5	-1.891	0.049

3 总 结

本文介绍了FAIMS技术的广泛应用与基本原理,利用Owlstone公司的Lonestar作为FAIMS分析仪对ECO、SAU、PAE的TH肉汤培养液及纯TH肉汤培养液4种样品进行检测,得到它们的离子迁移谱。对4种样品的离子迁移谱进行对比分析,提取特征点得到其指纹图谱,通过分析确定ECO与SAU的特征

离子峰。对于PAE得到了两种产物离子峰,其中右侧离子峰不稳定出现、左侧离子峰稳定出现,两种离子峰均与其他3种样品不一致,可以作为PAE的特征峰进行细菌识别。本文实验结果为FAIMS技术用于伤口细菌感染的快速检测提供了一定的实践依据,表明该技术在细菌检测领域具有潜在的可行性与发展前景。

【参考文献】

[1] BURYAKOV I A, KRYLOV E V, NAZAROV E G, et al. A new method of separation of multi-atomic ions by mobility at atmospheric pressure using a high-frequency amplitude-asymmetric strong electric field[J]. Int J Mass Spectrom Ion Processes, 1993, 128(3): 143-148.

[2] ZHANG J, LI L F, GUO D P, et al. Determination of hazardous chemicals by Microchip-based field asymmetric waveform ion mobility spectrometric technology[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013, 41(7): 986-992.

[3] CUMERAS R, GRÀCIA I, FIGUERAS E, et al. Finite-element analysis of a miniaturized ion mobility spectrometer for security applications[J]. Sens Actuators B, 2012, 170(31): 13-20.

[4] GABRYELSKI W, FROESE L K. Rapid and sensitive differentiation of anomers, linkage, and position isomers of disaccharides using high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS) [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2003, 14(3): 265-277.

[5] TAYLOR G N, MATHERLY R. Use of portable analytical methods to determine the stoichiometry of reaction for hexahydrotriazine-based hydrogen sulfide scavenger operations [J]. Anal Chem, 2014, 86(10): 4879-4882.

[6] 李庄, 林丙涛, 孔德义, 等. 痕量挥发性有机物的高场不对称波形离子迁移谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2011, 31(1): 12-15.

LI Z, LIN B T, KONG D Y, et al. FAIMS of trace volatile organic compounds [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2011, 31(1): 12-15.

[7] ZHUANG L I, LIN B T, CHEN C L, et al. Volatile phenolic compounds detection by 2D scanning high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2011, 39(1): 107-110.

[8] 陶羽宇, 李灵锋, 李鑫, 等. 用高场非对称波形离子迁移谱技术快速检测二乙醇胺[J]. 高等学校化学学报, 2013, 34(11): 2499-2504.

TAO Y Y, LI L F, LI X, et al. Rapid determination of diethanolamine by field asymmetric ion mobility spectrometry (FAIMS) technique [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2013, 34(11): 2499-2504.

[9] 李娟, 郭亚洁, 赵伟军, 等. 气相色谱-高场非对称离子迁移谱(GC-FAIMS)法应用于白酒的风味研究[J]. 食品安全质量检测学, 2014, 5(6): 1687-1694.

LI J, GUO Y J, ZHAO W J, et al. Study on liquor flavor by gas chromatography-field asymmetric ion mobility spectrometry method [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2014, 5(6): 1687-1694.

[10] 王琦, 余文静, 汪小知, 等. 芯片级高场非对称离子迁移谱技术快速识别不同种类的香水[J]. 分析实验室, 2013, 32(7): 26-28.

WANG Q, YU W J, WANG X Z, et al. Identification of different

- perfumes based on microchip-based FAIMS technique[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2013, 32(7): 26-28.
- [11] 汪小知, 李娟, 赵伟军. 高场非对称离子迁移谱(FAIMS)技术快速检测中药材中二氧化硫[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(9): 1611-1616.
- WANG X Z, LI J, ZHAO W J. Rapid detection of sulfur dioxide in Chinese herbal medicine by FAIMS [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2014, 34(9): 1611-1616.
- [12] ARASARADNAM R P, OUARET N, THOMAS M G, et al. A novel tool for non invasive diagnosis and tracking of patients with inflammatory bowel disease (IBD)[J]. Inflamm Bowel Dis, 2013, 19(5): 999-1003.
- [13] COVINGTON J A, WEDLAKE L, ANDREYEV J, et al. The detection of patients at risk of gastrointestinal toxicity during pelvic radiotherapy by electronic nose and FAIMS: a pilot study [J]. Sensors, 2012, 12(10): 13002-13018.
- [14] COVINGTON J A, WESTENBRINK E W, OUARET N, et al. Application of a novel tool for diagnosing bile acid diarrhoea [J]. Sensors, 2013, 13(9): 11899-11912.
- [15] RAMESH P A, MICHAEL J M, COURTENAY R F, et al. Detection of colorectal cancer (CRC) by urinary volatile organic compound analysis[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e108750.
- [16] RAMESH P A, ERIC W, MICHAEL J M, et al. Differentiating coeliac disease from irritable bowel syndrome by urinary volatile organic compound analysis-a pilot study [J]. PLoS One, 2014, 10(9): e107312.
- [17] COVINGTON J A, DERSCHEE M P, EDGE A S, et al. The application of FAIMS gas analysis in medical diagnostics [J]. Analyst, 2015, 140(20): 6775-6781.

(编辑:陈丽霞)

(上接第286页)

- [4] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国脑出血诊治指南(2014)[J]. 中华神经科杂志, 2015, 48(6): 435-444.
- Chinese Society of Neurology, Cerebrovascular Group of Chinese Society of Neurology. Guidelines for the diagnosis and treatment of cerebral hemorrhage in China (2014) [J]. Chinese Journal of Neurology, 2015, 48(6): 435-444.
- [5] KIDWELL C S, CHALELA J A, SAVER J L, et al. Comparison of MRI and CT for detection of acute intracerebral hemorrhage [J]. JAMA-J Am Med Assoc, 2004, 292(15): 1823-1830.
- [6] JIN G, SUN J, QIN M X, et al. A new method for detecting cerebral hemorrhage in rabbits by magnetic inductive phase shift [J]. Biosens Bioelectron, 2014, 52(2): 374-378.
- [7] SUN J, JIN G, QIN M X, et al. Detection of acute cerebral hemorrhage in rabbits by magnetic induction[J]. Braz J Med Biol Res, 2014, 47(2): 144-150.
- [8] 秦明新, 焦李成, 吕华, 等. 脑MIT单通道测量的正弦时变电磁场特性[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(23): 2172-2174.
- QIN M X, JIAO L C, LÜ H, et al. Characteristics of sinusoidally time-varying electromagnetic field in our single measurement channel of brain MIT [J]. Journal of the Fourth Military Medical University, 2004, 25(23): 2172-2174.
- [9] GONZÁLEZ C A, HOROWITZ L, RUBINSKY B. *In vivo* inductive phase shift measurements to detect intraperitoneal fluid [J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2007, 54(5): 953-956.
- [10] GRIFFITHS H, STEWART W, GOUGH W. Magnetic induction tomography: a measuring system for biological tissues [J]. Ann N Y Acad Sci, 1999, 873(1): 335-345.
- [11] 潘文才, 秦明新, 金贵, 等. 基于特征频带磁感应相位移谱检测家兔脑出血的实验研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2015, 32(3): 569-574.
- PAN W C, QIN M X, JIN G, et al. Experimental detection study on cerebral hemorrhage in rabbits based on magnetic induction phase shift spectroscopy under the feature band [J]. Journal of Biomedical Engineering, 2015, 32(3): 569-574.
- [12] 孙辉利, 余茜. 脑出血动物模型研究进展[J]. 局解手术学杂志, 2013, 22(1): 82-83.
- SUN H L, YU Q. Progress of studies on experimental animal models of intracerebral hemorrhage [J]. Journal of Regional Anatomy and Operative Surgery, 2013, 22(1): 82-83.
- [13] SCHEPPS J L, FOSTER K R. The UHF and microwave dielectric properties of normal and tumor tissue water content [J]. Phys Med Biol, 1980, 25(6): 1149-1159.

(编辑:谭斯允)