

10 帅波,沈霖,杨艳萍,等.加味青娥丸对模拟失重状态下小鼠骨显微结构和β-catenin及DKK-1表达水平的影响[J].中国临床新医学,2018,11(12):1186-1191.

11 Vanittanakom N,Cooper CR Jr,Fisher MC,et al. Penicillium marneffeii infection and recent advances in the epidemiology and molecular biology aspects[J]. Clin Microbiol Rev,2006,19(1):95-110.

12 Zheng J, Gui X, Cao Q, et al. A Clinical Study of Acquired Immunodeficiency Syndrome Associated Penicillium Marneffeii Infection from a Non-Endemic Area in China[J]. PloS One,2015,10(6):e0130376.

13 Le T, Van Kinh N, Cuc NTK, et al. A Trial of Itraconazole or Amphotericin B for HIV-Associated Talaromycosis[J]. N Engl J Med, 2017,376(24):2329-2340.

14 Vanittanakom N,Cooper CR Jr,Fisher MC,et al. Penicillium marneffeii infection and recent advances in the epidemiology and molecular biology aspects[J]. Clin Microbiol Rev,2016,19(1):95-110.

15 Supparatpinyo K, Chiewchanvit S, Hirunsri P, et al. Penicillium marneffeii infection in patients infected with human immunodeficiency virus[J]. Clin Infect Dis,1992,14(4):871-874.

16 Chen J, Zhang RF, Shen YZ, et al. Clinical Characteristics and Prognosis of Penicilliosis among Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients in Eastern China[J]. Am J Trop Med Hyg,2017,96(6):1350-1354.

17 Jones SA. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer[J]. Nat Rev Immunol,2018,18(12):773-789.

18 Epeldegui M, Lee JY, Martinez AC, et al. Predictive Value of Cytokines and Immune Activation Biomarkers in AIDS-Related Non-Hodgkin Lymphoma Treated with Rituximab plus Infusional EPOCH (AMC-034 trial)[J]. Clin Cancer Res,2016,22(2):328-336.

[收稿日期 2019-02-21][本文编辑 余军 吕文娟]

课题研究·论著

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术在直接鉴定血流感染病原菌中的应用

方盼盼, 杨俊梅, 杨俊文, 高凯杰, 王颖源

基金项目: 河南省医学科技攻关计划(联合共建)项目(编号:2018020677)

作者单位: 450018 河南,郑州大学附属儿童医院(河南省儿童医院、郑州儿童医院)、郑州市儿童感染与免疫重点实验室(方盼盼,杨俊梅,杨俊文,高凯杰),新生儿重症监护室(王颖源)

作者简介: 方盼盼(1988-),女,医学硕士,初级检验师,研究方向:临床检验诊断学。E-mail:fang_panpan@163.com

通讯作者: 杨俊文(1968-),女,大学本科,学士学位,主管技师,研究方向:医学微生物学。E-mail:511265759@qq.com

[摘要] **目的** 探讨利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术建立血流感染病原菌快速、准确的鉴定方法。**方法** 收集郑州大学附属儿童医院检验科2017-07~2017-12血培养仪阳性报警血培养瓶524个,抽吸血培养瓶中血液至血清分离胶管,采用差速离心法富集细菌,利用MALDI-TOF MS对富集后的菌液进行快速鉴定,并与传统培养24~48h后形成的菌落最终鉴定结果进行比较。**结果** 阳性报警血培养瓶524个,496个为单菌株血流感染,16个为混合菌感染,12例血培养报警假阳性结果。在496个单菌株所致血流感染样本中,菌株的属、种鉴定符合率分别为98.6%(489/496)和95.8%(475/496)。其中,120株革兰阴性菌属、种鉴定符合率分别为99.2%(119/120)和98.3%(118/120);376株革兰阳性菌属、种鉴定符合率分别为98.4%(370/376)和94.9%(357/376)。16个混合菌感染样本及12个血培养报警假阳性样本均未得到鉴定结果。**结论** 该研究利用MALDI-TOF MS对差速离心富集后的菌液进行直接鉴定,与传统的培养鉴定方法相比,对血流感染中主要病原菌的鉴定符合率较高,且方法快速、简便,成本低廉,有效缩短了检测时间,而且鉴定准确率高,适合在临床微生物实验室中推广应用。

[关键词] 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 血流感染; 细菌鉴定

[中图分类号] R 446.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2019)05-0518-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2019.05.12

Application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in direct identification of pathogenic bacteria in bloodstream infection FANG Pan-pan, YANG Jun-mei, YANG Jun-wen, et al. Zhengzhou Key Laboratory of Children's Infection and Immunity, the Affiliated Children's Hospital of Zhengzhou University (Children's Hospital of Henan Province, Zhengzhou Children's Hospital), Henan 450018, China

[Abstract] **Objective** To establish a rapid and accurate method for the identification of bloodstream infection pathogens by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).

Methods Five hundred and twenty-four blood culture bottles with positive alarm by blood culture instrument were collected in the Department of Clinical Laboratory of the Affiliated Children's Hospital of Zhengzhou University during July 2017 to December 2017. The blood was drawn from the blood culture bottles and moved to serum separation rubber tubes, where bacteria were enriched and collected using differential centrifugation. The enriched bacterial liquid was identified rapidly by MALDI-TOF MS, and the results of colony-forming units were compared with those of colony-forming units formed by traditional bacterial culture in 24 to 48 hours. **Results** Of the 524 positive blood culture samples, 496 were single strain bloodstream infections, 16 mixed bacteria infections and 12 blood cultures false positive result of the alarm. Among the 496 single-strain bloodstream infections, the genus and species identification rates of the strains were 98.6% (489/496) and 95.8% (475/496) respectively. Among them, 120 strains were Gram-negative bacteria with a species identification rate being 99.2% (119/120) and 98.3% (118/120), and 376 strains were Gram-positive genus with a species identification rate being 98.4% (370/376) and 94.9% (357/376). No identification results were obtained in 16 cases of mixed bacteria infection and 12 blood cultures with false positive alarms.

Conclusion MALDI-TOF MS is used to directly identify the bacterial liquid after differential centrifugation. Compared with the traditional culture identification method, MALDI-TOF MS has higher identification accuracy rate of the main pathogens in bloodstream infections, and MALDI-TOF MS is a fast, simple and low-cost method. MALDI-TOF MS can effectively shorten the time of detection and has high accuracy of identification, and is suitable to be applied in a clinical microbiology laboratory.

[Key words] Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS); Bloodstream infection; Bacterial identification

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 是近年发展起来的一种新型细菌鉴定技术,其不仅可以快速准确地鉴定菌落,还可用于一些无菌样本(如血液和尿液)的直接鉴定,极大地缩短了检测时间^[1]。随着技术的不断改进和数据库的完善,MALDI-TOF MS 已可在细菌不经过前处理的情况下直接检测细菌,被认为是鉴定细菌最有效的方法之一,血培养阳性标本的鉴定时间由 24 ~ 48 h 缩短为几十分钟,为临床用药提供了更及时的指导^[2]。PhoenixTM-100 全自动微生物鉴定药敏分析仪是一种临床检验工作中常用的细菌分离株鉴定及药物敏感性试验分析系统。本研究采用差速离心法,在血清分离胶管中富集血培养阳性瓶中的菌液,利用 MALDI-TOF MS 对血培养阳性样本直接进行检测,并与传统培养后运用 PhoenixTM-100 全自动微生物鉴定药敏分析系统进行菌落鉴定的结果进行比较,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 样本来源 收集 2017-07 ~ 2017-12 郑州大学附属儿童医院检验科血培养仪阳性报警血培养瓶

524 个,单菌株感染样本 496 个,其中革兰阴性菌感染样本 120 个,革兰阳性菌感染 376 个,混合感染 16 个。血培养报警假阳性结果 12 例,假阳性率为 2.3%。

1.2 仪器与试剂 BACTEC FX25 全自动血培养仪(美国 BD 公司);德国 Bruker 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪、基质 α -氰基-4-羟基肉桂酸(德国 Bruker 公司);PhoenixTM-100 全自动微生物鉴定药敏分析仪、3.5 ml 血清分离胶管(美国 BD 公司);甲酸(美国 Sigma 公司)。

1.3 血培养阳性瓶病原菌的直接鉴定

1.3.1 血培养阳性瓶的细菌富集 采用差速离心法进行细菌富集。第一步:红细胞的初步滤除,用 5 ml 无菌注射器吸取 3 ml 阳性血培养瓶中的血液至血清分离胶管中,45 × g 低速离心 5 min,转移上清液至另一血清分离胶管中;第二步:细菌沉淀的初步富集,以 2 862 × g 离心 5 min,弃上清液;第三步:细菌沉淀的洗涤,用 3 ml 无菌等渗氯化钠溶液充分重悬分离胶边缘的细菌沉淀;第四步:红细胞的再次滤除,45 × g 低速离心 5 min,再次将上清液转移至血清

分离胶管中;第五步:细菌沉淀的最终富集,2 862 × g 离心 5 min,弃上清,加入 0.5 ml 无菌等渗氯化钠溶液重悬细菌沉淀并转移至 EP 管中用于 MS 鉴定。若样本来源于厌氧血培养瓶,可直接从第二步富集过程进行,第五步重复一次。

1.3.2 MALDI-TOF MS 鉴定 吸取 1 μl 处理后菌液点样到 MALDI 靶板上,室温干燥;再将 1 μl 基质点样到样品点上,室温干燥后上质谱仪检测,采集蛋白质指纹图谱,运用 MALDI Biotyper 软件进行数据分析和比对,得出鉴定结果。若为革兰阳性菌样本,菌液点样干燥后先加 1 μl 70% 甲酸处理,待干燥后再加 1 μl 基质进行检测。质谱中不同鉴定分值的含义:0.000 ~ 1.699 为没有可信的鉴定结果;1.700 ~ 1.999 为鉴定到属的水平;2.000 ~ 2.299 为鉴定到种的水平;2.300 ~ 3.000 为完全可靠地鉴定到种的水平。

1.4 血培养阳性瓶应用 Phoenix™-100 全自动微生物鉴定药敏分析系统进行鉴定 血培养瓶经血培养仪阳性报警后按传统流程处理,涂片革兰染色、显微镜观察,转种血平板和巧克力平板或厌氧平板,培养 24 ~ 28 h 获得纯菌落后,运用 Phoenix™-100 进行菌落鉴定和药物敏感性试验。

1.5 手工生化方法进行细菌鉴定 血培养瓶经血培养仪阳性报警后按传统流程处理,涂片革兰染色、显微镜观察、转种血和巧克力平板或厌氧平板,培养 24 ~ 48 h 获得纯菌落后,同时用 MALDI-TOF MS 和 Phoenix100 进行菌落鉴定,仪器对菌落鉴定结果不一致时采用传统手工生化方法确认,严格按照《全国临床检验操作规程》(第三版)操作。

2 结果

2.1 MALDI-TOF MS 对血流感染病原菌的直接鉴定结果 在 496 个单菌株所致血流感染样本中,菌株的属、种鉴定符合率分别为 98.6% (489/496) 和 95.8% (475/496)。其中 120 株革兰阴性菌属、种鉴定符合率分别为 99.2% (119/120) 和 98.3% (118/120), 376 株革兰阳性菌属、种鉴定符合率分别为 98.4% (370/376) 和 94.9% (357/376)。直接鉴定有结果但与最终鉴定不一致的主要是肠杆菌科细菌中的 1 株福氏志贺菌被直接鉴定为大肠埃希菌,葡萄球菌中的 1 株佩藤科夫葡萄球菌被直接鉴定为人葡萄球菌,肠球菌中 1 株棉子糖肠球菌被直接鉴定为鸟肠球菌,16 个混合菌感染样本及 12 个血培养报警假阳性样本均未得到鉴定结果。见表 1,2。

表 1 革兰阴性菌单菌株血流感染直接鉴定和菌落最终鉴定结果比较(株)

细菌名称	直接鉴定	菌落最终鉴定	
		MALDI-TOF MS	Phoenix™-100/其他 [△]
肺炎克雷伯菌肺炎亚种	34	34	34
大肠埃希菌	30	30	30
鲍曼不动杆菌	11	11	11
沙门菌某些种	8	8	8
铜绿假单胞菌	7	7	7
嗜麦芽寡养单胞菌	7	7	7
琼氏不动杆菌	4	4	4
阴沟肠杆菌	6	6	6
洋葱伯克霍尔德菌	3	3	3
流感嗜血杆菌	2	2	2
沙门氏菌某些种	2	2	2
产酸克雷伯菌	2	2	2
柯氏枸橼酸杆菌	1	1	1
福氏志贺菌	1*	1*	1 [△]
产吡啶金黄杆菌	-	1	1
猪霍乱沙门氏菌猪霍乱亚种	1	1	1

注:“-”为未鉴定出结果;* 鉴定不一致结果;[△]手工生化方法

表 2 革兰阳性菌单菌株血流感染直接鉴定和菌落最终鉴定结果比较(株)

细菌名称	直接鉴定	菌落最终鉴定	
		MALDI-TOF MS	Phoenix™-100/其他 [△]
表皮葡萄球菌	139	139	139
人葡萄球菌	80	80	80
溶血葡萄球菌	35	35	35
金黄色葡萄球菌	27	27	27
肺炎链球菌	23	23	23
屎肠球菌	21	21	21
腐生葡萄球菌	14	14	14
缓症链球菌	7	7	7
沃氏葡萄球菌	7	7	7
粪肠球菌	4	4	4
头状葡萄球菌	4	4	4
施氏葡萄球菌	3	3	3
产单核细胞李斯特氏菌	2	2	2
无乳链球菌(B群)	2	2	2
纹带棒杆菌	-	2	2
棉子糖肠球菌	1*	1	1
佩藤科夫葡萄球菌	1*	1	1
路邓葡萄球菌	-	1	1 [△]
牛链球菌 II 型	1	1	1
少酸链球菌	1	1	1
血液链球菌	1	1	1

注:“-”为未鉴定出结果;* 鉴定不一致结果;[△]手工生化方法

2.2 血培养阳性样本细菌鉴定分值分布 血培养阳性瓶内细菌经富集后上 MALDI-TOF MS 进行检测, 鉴定分值 > 1.700 占 98.6% (489/496), 其中革兰阴性菌除 1 株产吡啶金黄色杆菌未鉴定出结果外, 其余鉴定分值均 > 1.700; 革兰阳性菌中有 6 株鉴定分值 < 1.700, 包括 2 株未鉴定出的棒杆菌, 1 株未鉴定出的路邓葡萄球菌, 1 株未准确鉴定的佩藤科夫葡萄球菌(菌落鉴定为人葡萄球菌), 1 株未准确鉴定的鸟肠球菌(菌落鉴定为棉子糖肠球菌), 1 株鉴定分值较低但与菌落结果相符的少酸链球菌。具体鉴定分值分布见表 3。

表 3 单一菌株血流感染样本质谱直接鉴定分值分布(株)

质谱鉴定分值	革兰阴性菌	革兰阳性菌
0.000 ~ 1.699	1	6
1.700 ~ 1.999	11	40
2.000 ~ 2.299	96	286
2.300 ~ 3.000	12	44
合计	120	376

3 讨论

3.1 血流感染是患者病死率增加的重要原因, 血培养是血流感染病原菌诊断的重要依据, 对患者血培养结果进行监测, 了解血液感染病原菌分布及耐药情况, 能最大限度地减少用药的盲目性^[3], 有效抗菌治疗每延迟 1 h, 病死率约增加 8.0%^[4]。因此, 致病菌的迅速鉴定和抗菌药敏试验对改善患者预后十分重要。实验室血培养仍为主要的确诊手段, 但常规培养鉴定周期长, 不利于早期干预治疗^[5], 临床对血流感染病原菌快速鉴定的需求日益迫切。因此, 将 MALDI-TOF MS 直接应用于阳性血培养瓶中病原体的鉴定已越来越得到重视^[6]。MALDI-TOF MS 虽然不能完全取代手工方法和传统技术对病原菌进行鉴定, 特别是在直接鉴定血培养阳性标本方面, 其准确性和可靠性还需要临床检验工作的进一步验证, 但是, 这项技术对于病原菌鉴定的发展意义重大, 与传统的生化及表型鉴定方法对比, MALDI-TOF MS 具有操作简单、快速、自动化程度高、高通量的特点^[7]。MALDI-TOF MS 既可以对临床标本分离出的纯菌落进行检测, 也可以对临床上未经分离培养的标本进行直接检测^[4,8], 有效缩短了检测时间, 鉴定准确率高, 为血流感染的快速诊断提供了有力的检测手段。

3.2 本研究中在 496 份单菌株所致血流感染样本中, 菌株的属、种鉴定符合率分别为 98.6% (489/496) 和 95.8% (475/496), 与近年来国内外同类研究^[4,8]

结果基本相符。120 株革兰阴性菌属、种鉴定符合率分别为 99.2% (119/120) 和 98.3% (118/120), 比 Arroyo 和 Denys^[4]的研究中革兰阴性菌属、种鉴定符合率[分别为 94.0% (188/200) 和 90.5% (181/200)]稍高。直接鉴定有结果但与最终鉴定不一致的主要是肠杆菌科细菌中 1 株福氏志贺菌被直接鉴定为大肠埃希菌, 志贺菌和大肠埃希菌在基因角度上符合同一个种^[9], MALDI-TOF MS 目前的数据库不能将大肠埃希菌和志贺菌区分, 在临床工作中需要附加生化反应及血清学试验, 以进行志贺菌的鉴定、排除。本研究中直接鉴定出 2 株产单核细胞李斯特氏菌和 2 株无乳链球菌(B 群), 鉴定分值均 > 2.000, 可将仪器报警阳性鉴定到种的时间由原来的 48 h 缩短至 1 h 左右, 患儿均为不足 1 个月的新生儿, 起病急病程发展快, 为临床诊治节约了宝贵时间。35 株链球菌直接鉴定结果与最终结果全部相符, 即使是易鉴定错误的牛链球菌也均鉴定相符。另外有 16 个血流感染样本为混合菌感染, 但均未鉴定出结果, 这需与对应的混合感染菌数据库比较后才可更好鉴定^[10]。

综上所述, 较常规方法, MALDI-TOF MS 具有检测迅速(只需 1 h)、操作简单、不需要特殊设备、价格低廉、准确率高等优点。本方法实用性强, 可以临床推广使用, 但仍然不能完全替代传统的鉴定方法。目前, MALDI-TOF MS 仍存在不少问题值得改进, 例如微生物生长培养基、培养时间、质谱分析前处理等因素影响实验的重复性; 对于进化程度相近的物种难以辨别; 数据库尚不完善等。未来应进一步探索其实验室的操作标准及对革兰阳性球菌的鉴定和用 MALDI-TOF MS 进行耐药性的分析, 帮助临床更快、更准确地得到鉴定结果。

参考文献

- 1 Wang XH, Zhang G, Fan YY, et al. Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry[J]. J Microbiol Methods, 2013, 92(3): 231 - 235.
- 2 Bhavsar SM, Dingle TC, Hamula CL. The impact of blood culture identification by MALDI-TOF MS on the antimicrobial management of pediatric patients[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2018, 92(3): 220 - 225.
- 3 覃 凌, 王慕云, 汪利娥. 血液病合并血流感染患者的病原菌分布及药敏分析[J]. 中国临床新医学, 2013, 5(10): 971 - 973.
- 4 Arroyo MA, Denys GA. Parallel Evaluation of the MALDI Sepsityper and Verigene BC-GN Assays for Rapid Identification of Gram-Negative Bacilli from Positive Blood Cultures[J]. J Clin Microbiol, 2017,

55(9):2708-2718.

5 詹李彬,陈国燊. 新生儿院内感染败血症 19 例临床分析[J]. 中国临床新医学,2016,9(10):912-915.

6 Zhou M, Yang Q, Kudinha T, et al. An Improved In-house MALDI-TOF MS Protocol for Direct Cost-Effective Identification of Pathogens from Blood Cultures[J]. Front Microbiol, 2017, 8:1824.

7 Barnini S, Brucculeri V, Morici P, et al. A new rapid method for direct antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood cultures[J]. BMC Microbiol, 2016, 16(1):185.

8 谢小芳,周惠琴,郑毅,等. 基质辅助激光解吸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,2016,9(2):152-155.

9 韦柳华,罗国兰,李梦薇,等. VITEK MS 质谱仪错误鉴定福氏志贺菌 1 例[J]. 临床检验杂志,2016,34(4):315-316,320.

10 Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, et al. Real-time identification of bacteria and Candida species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol,2010,48(5):1542-1548.

[收稿日期 2018-07-13][本文编辑 余军 吕文娟]

课题研究 · 论著

人工皱缩对玻璃化冻融囊胚复苏结局的影响

周亭亭, 薛林涛, 王世凯, 谭卫红, 成俊萍, 毛献宝, 李政达, 张小慧, 韦娉娉

基金项目: 广西卫健委科研课题(编号:Z2015305)

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院生殖医学与遗传中心

作者简介: 周亭亭(1991-),女,硕士,技师,研究方向:生殖医学。E-mail:1070938352@qq.com

通讯作者: 薛林涛(1982-),男,博士,副主任技师,研究方向:生殖医学。E-mail:ltxgxh@163.com

[摘要] **目的** 探讨不同人工皱缩方式对囊胚玻璃化冻融后复苏结局的影响。**方法** 收集体外受精(IVF)/卵泡浆内单精子注射(ICSI)治疗周期病人冷冻或移植后的 246 枚囊胚,随机分为对照组(囊胚不进行皱缩,直接玻璃化冻融)、激光皱缩组(囊胚采用激光打孔法使其完全皱缩后行玻璃化冻融)、机械皱缩组(囊胚采用机械挤压法使其完全皱缩后行玻璃化冻融),每组 82 枚。比较三组间的复苏率和孵出率。**结果** 激光皱缩组和机械皱缩组囊胚玻璃化冻融后的复苏率和孵出率均高于对照组($P < 0.05$)。机械皱缩组和激光皱缩组的优质囊胚孵出率均高于对照组且差异有统计学意义($P < 0.05$)。激光皱缩组优质囊胚复苏率及孵出率均高于机械皱缩组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。机械皱缩组和激光皱缩组的劣质囊胚复苏率、孵出率均高于对照组($P < 0.05$),激光皱缩组劣质囊胚孵出率高于机械皱缩组($P < 0.05$)。**结论** 人工皱缩去除囊胚腔液能够显著改善囊胚玻璃化冻融复苏结局,而激光法皱缩是最佳的人工皱缩方式。

[关键词] 人工皱缩; 囊胚; 玻璃化冷冻; 复苏率; 孵出率

[中图分类号] R 715 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2019)05-0522-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2019.05.13

Effects of artificial shrinkage before vitrification on survival rate and hatching efficiency in human blastocysts freeze-thaw ZHOU Ting-ting, XUE Lin-tao, WANG Shi-kai, et al. Reproductive Medical and Genetic Center, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of different artificial shrinking methods before vitrified cryopreservation on survival rate and hatching efficiency in human blastocysts freeze-thaw. **Methods** Two hundred and forty-six surplus blastocysts after vitrification or transplantation in IVF/ICSI cycles were divided into control group (with untreated blastocysts), laser drilling group (with artificial shrinking performed by a laser pulse prior to vitrification), and pipetting group (with mechanical extruding the blastocyst prior to vitrification), with 82 cases in each group. The survival rate and hatching rate were compared among the three groups. **Results** The survival rate and the hatching rate in the laser drilling group and the pipetting group were higher than those in the control group ($P < 0.05$).