

- [17] Wang N, Zhou Y, Jiang L, et al. Urinary microRNA-10a and microRNA-30d serve as novel, sensitive and specific biomarkers for kidney injury[J]. PLoS ONE, 2012, 7(12): e51140.
- [18] Luo Y, Wang C, Chen X, et al. Increased serum and urinary MicroRNAs in children with idiopathic nephrotic Syndrome[J]. Clin Chem, 2013, 59(4): 658-666.
- [19] Li JY, Yong TY, Michael MZ, et al. Review: the role of microRNAs in kidney disease[J]. Nephrology (Carlton), 2010, 15(6): 599-608.
- [20] Argyropoulos C, Wang K, McClarty S, et al. Urinary microRNA profiling in the nephropathy of type 1 diabetes[J]. PLoS ONE, 2013, 8(1): e54662.
- [21] Hartono C, Muthukumar T, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of acute rejection of renal allografts[J]. Curr Opin Organ Transplant, 2010, 15(1): 35-41.
- [22] Lorenzen JM, Volkmann I, Fiedler J, et al. Urinary miR-210 as a mediator of acute T-cell mediated rejection in renal allograft recipients[J]. Am J Transplant, 2011, 11(10): 2221-2227.
- [23] Sarma NJ, Tiriveedhi V, Ramachandran S, et al. Modulation of immune responses following solid organ transplantation by microRNA[J]. Exp Mol Pathol, 2012, 93(3): 378-385.
- [24] Zhu H, Fan GC. Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease[J]. Am J Cardiovasc Dis, 2011, 1(2): 138-149.
- [25] Gidlöf O, Andersson P, vander Pals J, et al. Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with ST elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples[J]. Cardiology, 2011, 118(4): 217-226.
- [26] Cheng Y, Wang X, Yang J, et al. A translational study of urine miRNAs in acute myocardial infarction[J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 53(5): 668-676.
- [27] Duan XX, Zhou X, Wang XB, et al. Urine cardiac specific microRNA-1 level in patients with ST segment elevation acute myocardial infarction[J]. Zhongguo Weizhongbing Jijiu Yixue, 2012, 24(12): 709-712.
- [28] Wang G, Tam LS, Li EK, et al. Serum and urinary cell-free MiR-146a and MiR-155 in patients with systemic lupus erythematosus[J]. J Rheumatol, 2010, 37(12): 2516-2522.
- [29] Wang G, Tam LS, Li EK, et al. Serum and urinary free microRNA level in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Lupus, 2011, 20(5): 493-500.
- [30] Roos PH, Jakubowski N. Methods for the discovery of low-abundance biomarkers for urinary bladder cancer in biological fluids[J]. Bioanalysis, 2010, 2(2): 295-309.
- [31] Blondal T, Jensby NS, Baker A, et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids[J]. Methods, 2013, 59(1): 164-169.
- [32] Garcia-Schwarz G, Rogacs A, Bahga SS, et al. On-chip isotachopheresis for separation of ions and purification of nucleic acids[J]. J Vis Exp, 2012, (61): e3890.
- [33] Russo F, Di BS, Nigita G, et al. miRandola: extracellular circulating microRNAs database[J]. PLoS ONE, 2012, 7(10): e47786.
- [34] Yang X, Greenhaw J, Shi Q, et al. Identification of urinary microRNA profiles in rats that may diagnose hepatotoxicity[J]. Toxicol Sci, 2012, 125(2): 335-344.
- [35] Leuenberger N, Jan N, Pradervand S, et al. Circulating microRNAs as long-term biomarkers for the detection of erythropoiesis-stimulating agent abuse[J]. Drug Test Anal, 2011, 3(11/12): 771-776.

(收稿日期: 2015-03-25 修回日期: 2015-04-15)

• 综 述 •

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱在血培养阳性标本鉴定方面的应用进展

赵冠华, 张霄霄, 汪定成, 董 轲 综述, 张惠中[△]审校(第四军医大学唐都医院检验科, 西安 710032)

【关键词】 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱; 血培养; 鉴定

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2015. 18. 069 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)18-2801-04

如今, 随着抗菌药物特别是广谱抗菌药物的广泛应用, 细菌耐药问题已逐渐成为全球性问题。怎样及时而有效地选择抗菌药物成为临床医生面临的一个难题。特别是在菌血症或是脓毒症等严重感染患者中, 早期选用敏感抗菌药物可以有效降低病死率^[1]。但传统的细菌鉴定多采用手工法, 依靠形态学、革兰染色镜检和生物化学反应, 速度慢, 不能满足临床诊断和治疗的需要。近年来新发展起来的基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)为细菌鉴定带来了新的进

展, 特别是 MALDI-TOF MS 技术对血培养阳性标本直接鉴定的应用, 可以将原有血培养阳性标本的鉴定时间由 24~48 h 缩短为几十分钟(含标本预处理所用的时间), 为临床用药提供了更及时的指导。本文就 MALDI-TOF MS 在血培养阳性标本鉴定方面取得的进展予以综述。

1 MALDI-TOF MS 技术直接鉴定血培养标本

1.1 细菌的鉴定 临床上送检的血培养标本多来自血液或是无菌部位的体液, 培养阳性一般意味着患者感染严重, 需要及

[△] 通讯作者, E-mail: huizz328@163. com。

时治疗。但是微生物实验室常规采用的传统手工方法或是借助半自动仪器,都需要 24~48 h 才能对病原菌进行鉴定,影响临床及时选用有效的抗菌药物。

La Scola 和 Raoult^[2]首先在 2009 年提出用三氟乙酸或蚁酸裂解菌体蛋白质的方式直接检测血培养阳性的标本。在使用三氟乙酸处理后,对于 562 例只包含一种病原菌的血培养阳性标本,有 370 例(66%)可以被正确识别。但是对草绿色链球菌的鉴别能力较差,大多不能鉴定,鉴定出的 1 例也被证明是假阳性。而对于 22 例含有两种或两种以上不同的细菌的阳性血培养标本,有 18 例标本鉴定出了一种细菌,2 例标本不能鉴别,另外 2 例标本鉴别错误。

随后,大量的研究表明,MALDI-TOF MS 可以直接对血培养标本进行鉴定,从而省去了转种于培养基上孵育的时间。Romero-Gomez 等^[3]和 Meex 等^[4]均认为 MALDI-TOF MS 对革兰阴性细菌的鉴别能力远远强于对革兰阳性菌的鉴别能力。Romero-Gomez 等^[3]采用 MALDI-TOF MS 对 324 例单一菌血症血培养阳性标本进行鉴定,其中革兰阴性菌 257 株,革兰阳性菌 67 株。MALDI-TOF MS 可以直接鉴定肠杆菌的有 97.7%,非发酵革兰阴性杆菌的有 75%,金黄色葡萄球菌的有 75.8%,凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)和肠球菌的有 63.3%。Meex 等^[4]认为对于含有单种细菌标本的革兰阳性菌,Sepsityper 试剂盒和使用皂角苷处理在种的水平可以正确鉴定 58%和 52%的细菌。对革兰阴性菌,MALDI-TOF MS 的 Sepsityper 试剂盒和皂角苷的方法分别可以在 82.5%和 90%的水平正确鉴定到种。

针对文献报道的 MALDI-TOF MS 对葡萄球菌和链球菌的鉴定可信度较差的问题,多个研究也已经进行了探索。Dupont 等^[5]、Kilic 和 Baysallar^[6]以及 Lopez 等^[7]使用 MALDI-TOF MS 针对特定细菌的鉴别进行了研究。Dupont 等^[5]对临床分离的 20 种 234 株 CNS 用 MALDI-TOF-MS、Phoenix 和 VITEK-2 三种系统分别鉴定,鉴定的总体正确率分别为 93.2%、75.6%和 75.2%。Kilic 和 Baysallar^[6]认为对于研究中 69 例患者的 96 个含革兰阳性球菌的血培养阳性标本,MALDI-TOF MS 可以对金黄色葡萄球菌鉴定到属和种的水平为 100%,对 CNS 鉴定到属和种的水平为 96.6%。Lopez 等^[7]比较了 MALDI-TOF MS 和 API20 系统对草绿色链球菌的鉴别能力,对 124 例含草绿色链球菌的血培养阳性标本进行鉴定后发现,API20 系统和 MALDI-TOF 系统鉴定到种的准确性分别为 60.5%和 73.4%,鉴定到属的准确性分别为 70%和 94.3%。

Justesen 等^[8]和 Bess 等^[9]则分别对 MALDI-TOF MS 鉴别厌氧菌和空肠弯曲菌属的情况作了研究。Justesen 等^[8]对 13 个属(主要是拟杆菌属、梭状芽孢杆菌、梭杆菌属、乳杆菌属、韦荣菌属、痤疮丙酸杆菌等)39 个种的 120 例含厌氧菌的标本进行了鉴定,MALDI-TOF MS 可以准确鉴定到种的水平分别为 70 例(58.3%)和 60 例(50%)。Bess 等^[9]用传统方法、分子生物学方法(实时 PCR 测序)和 MALDI-TOF MS 方法对 1 007 例含空肠弯曲菌的临床标本进行鉴定,并把分子生物学方法作为金标准。MALDI-TOF MS 方法鉴定空肠弯曲杆菌空肠亚种的准确性为 99.4%,空肠弯曲杆菌空肠亚种以外的空肠弯曲菌的准确性达到了 100%。

对于不同研究中,MALDI-TOF MS 方法对细菌鉴定准确率不同的原因,目前尚缺乏明确的观点。有文献认为不同的仪器和系统也可能对 MALDI-TOF MS 的鉴别能力产生影响。

Chen 等^[10]对法国生物梅里埃 Vitek MS IVD 和布鲁克道尔顿的 Microflex LT Biotyper 两种系统直接鉴定血培养阳性标本的情况进行比较,两种系统都联合应用 Sepsityper 试剂盒,对于 181 例单一病原菌的血培养阳性标本,Biotyper 系统和 Vitek MS IVD 系统分别鉴定到种属的水平为 177 株(97.8%)和 167 株(92.3%)。通过两个系统对病原菌的鉴定,作者认为 Biotyper 系统比 Vitek MS IVD 系统有更准确的鉴定能力($P=0.016$)。

现有的文献表明,MALDI-TOF MS 技术可以快速、准确地对血培养阳性标本进行直接鉴定,为临床的诊治提供快速、可靠的依据。各个研究间 MALDI-TOF MS 技术对血培养阳性标本直接进行鉴定的准确性不同是由多种因素引起的,如样本量的大小、研究中各种病原菌所占的比例、预处理试剂和程序的差别、使用不同的系统等。另外,许多试验只对限定的一种或多种病原菌进行鉴定,缺少盲法也会对结果产生不同程度的影响。

1.2 真菌的鉴别 由于免疫抑制剂的大量使用和临床收治危重患者的增多,真菌感染在临床送检标本中也不断增加。MALDI-TOF MS 技术的不断发展也实现了直接对血培养阳性标本中真菌的鉴定。Marinach-Patrice 等^[11]较早尝试直接从阳性血培养标本中鉴定酵母菌,以减少 1~3 d 转种培养时间对临床调整治疗带来的不利影响。Marinach-Patrice 等^[11]先将白色念珠菌接种于血培养瓶,再用 MALDI-TOF MS 对标本进行分析,以建立质谱指纹数据库。最后用单独的模拟血液培养阳性的 36 个标本(属于 6 个菌种)进行验证,初步证实了方法的可行性。

随后有文献报道,MALDI-TOF MS 可以很好地对含真菌的血培养阳性标本进行鉴别。Yan 等^[12]对 42 例含单种酵母菌的血培养阳性标本进行了鉴定,认为 MALDI 的 Biotyper 系统加上应用 Sepsityper 标本处理程序可以正确识别 42 例标本到种的水平,包括 28 株(66.7%)白色念珠菌、8 株(19%)近平滑念珠菌、5 株(11.9%)热带念珠菌和 1 株(2.4%)新型隐球菌。除此之外,还摸索出了血培养中酵母的直接检测低限为 5.9×10^5 CFU/mL(种内变异系数为 1.8%~3.6%,种间变异系数为 2.9%)。Spanu 等^[13]对罗马的 2 个生物实验室进行的观察性研究表明,MALDI Biotyperr 系统可以对血培养阳性标本中的酵母菌直接在种的水平鉴定,研究中 MALDI-TOF MS 正确鉴定了 195 株白色念珠菌中的 187 株(95.9%),148 株非白色念珠菌中的 128 株(86.5%)。Yaman 等^[14]将 MALDI-TOF MS 与常规方法联合自动化 Vitek 2 YST 板进行对比,对 281 例血培养阳性的念珠菌进行鉴定,发现 MALDI-TOF MS 可以在种的水平 100%正确鉴定 281 株临床分离的念珠菌。

有文献报道,MALDI-TOF MS 对临床标本中丝状真菌的鉴别正确率达到 85.9%^[15]。但对于 MALDI-TOF MS 直接鉴定血培养阳性标本中的丝状真菌,目前文献报道的相对较少,这可能是由于血培养阳性标本中分离的丝状真菌数量和种类较少,缺乏相关的研究造成的。

2 直接检测细菌的耐药性

MALDI-TOF MS 技术应用于临床病原菌的检测后,不能对病原菌进行药敏检测成为其明显的不足。但随后不断有文献报道通过各种改良方法直接对病原菌进行药敏测定。目前,对血培养阳性细菌直接进行耐药性的鉴定主要集中在 β -内酰胺酶活性和对碳青霉烯类抗菌药物的耐药性检测。Neumaier 等^[16]将氨苄西林作为耐 β -内酰胺酶活性大肠杆菌菌株的替代

指标,通过将血培养阳性标本中的菌液与氨苄西林培养液共同培养后,用 MALDI-TOF MS 区分耐氨苄西林的大肠杆菌,精度高达 100%,这种方法也得到了认可。Sparbier 等^[17]通过将血培养阳性标本中的少量菌液(1 mL)经过 Sepsityper 配套试剂盒处理后,与相应的抗菌药物培养液(大肠杆菌用氨苄西林、肺炎克雷伯菌用厄他培南)共同培养 3 h,通过质谱仪测定两种细菌的峰值并与标准对比来判断其 β -内酰胺酶活性。Oviano 等^[18]对 141 例(13 例菌血症、128 例接种了临床分离菌)血培养阳性的标本进行了研究,通过使用抗菌药物头孢噻肟、头孢他啶来判断细菌 β -内酰胺酶的活性,研究中添加了克拉维酸以排除非耐药机制的存在。通过测量峰谱,对血培养肠杆菌科细菌中 ESBL 检测的灵敏度高达 99%。Carvalhaes 等^[19]对 100 例随机选择的血培养阳性标本进行检测,发现在与抗菌药物共同孵育 4 h 后,可以检测 29 例碳青霉烯类耐药标本中的 21 例,正确率达 72.4%,特别是对于 KPC-2 基因和 SPM-1 基因所编码耐药性的菌株,达到 100%。而对于 OXA-23 基因编码的鲍曼不动杆菌菌株虽然不能在第 1 天发现,但可以对其转种培养的菌株全部正确检测。

3 MALDI-TOF MS 技术对临床指导意义的研究

MALDI-TOF MS 技术对于临床病原菌鉴定的重要性就在于可以及早对细菌进行鉴定,指导临床的用药。但是由于目前推广的主要是对病原菌种类进行鉴别,不能直接进行药物敏感试验。对检测结果的提速对于临床指导的重要性尚存在一些疑问。部分文献针对 MALDI-TOF MS 的引入是否可以缩短经验性广谱抗菌药物的持续时间和是否有利于更快治疗患者进行了相关研究。Glans 等^[20]研究了实验室引入 MALDI-TOF MS 前后两个阶段的情况并进行了分析。引入前有 42 例患者的 60 例血培养阳性标本纳入了分析,引入后有 57 例患者的 80 例血培养阳性标本纳入了分析。通过分析细菌鉴定对临床用药的影响后发现,多数患者开始经验性治疗时使用一种广谱抗菌药物,使用 MALDI-TOF MS 进行细菌鉴定后,发送的报告缩短了感染患者的广谱抗菌药物治疗时间,与革兰阴性菌相比,革兰阳性菌缩短的时间更明显(从 18.6 h 减少到 10.5 h)。同时,MALDI-TOF MS 的使用,也能够更快地判断血培养阳性是否只是一种污染,从而终止非必要的治疗。Hodiamont 等^[21]通过对 73 例连续血培养阳性的患者用药情况进行分析后得出结论,MALDI-TOF MS 对病原菌的鉴定结果可以使多达 29% 的患者用药得到调整,因此可以作为临床诊治的有效辅助诊断技术。Clerc 等^[22]对革兰阴性菌的菌血症患者进行了前瞻性的研究,认为对于超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)和多重耐药低流行的革兰阴性菌的地区,MALDI-TOF MS 对血培养阳性的革兰阴性菌血症的鉴定可以使多达 35.1% (71/202) 的患者用药得到调整。

总的来说,这种与临床相关的研究有很大实用价值,对 MALDI-TOF MS 的推广使用也更有说服力。但目前相关研究还比较少,降低了其证据的支持力。与之相比,大规模多中心的临床研究,特别是包含治疗费用、住院时间等综合因素的研究,更有指导性。

4 MALDI-TOF MS 相关的探索性研究

4.1 预处理方法的比较 各篇文献所报道的对血培养阳性标本直接鉴别的正确鉴别能力不同,可能与血培养阳性标本预处理方法不同相关。Saffert 等^[23]评估了分析前差速离心、10% 烷基硫酸钠(SDS)和 Sepsityper 试剂盒 3 种预处理方法处理血培养阳性标本对于 MALDI-TOF MS 鉴定细菌的影响。鉴定

属和种的临界值分别取系统规定的分数 1.700~1.999 和大于或等于 2.0。通过差速离心处理的 79 例血培养阳性标本鉴定到属和种的水平正确例数分别为 51 例(65%)和 34 例(43%)。用 SDS 和 Sepsityper 试剂处理的 101 例标本鉴定到属的水平均为 77 例(76%),鉴定到种的水平分别为 49 例(49%)和 54 例(54%)。

4.2 混合菌鉴定 MALDI-TOF MS 应用于临床细菌的鉴别以来,大量的文献都表明这种技术尚不能用于混合细菌的鉴定。而 Wenzel 等^[24]则在研究中使用新的方法和计算程序为实时检测混合细菌标本提供了可能。其先制备了不同比率的细菌混合物,使用 MALDI-TOF MS(Biotyper 2.0)软件分析。同时,用一种新的程序比对混合细菌的质谱图,建立混合细菌相关数据库,一些两种细菌混合生长的标本,包括人工制备和血培养得到的标本,在使用新建立的混合菌的数据库和计算程序后,可以被正确鉴别。这项研究提出了应用新的计算程序和新的数据库直接检测混合感染的血培养标本的新思路。

4.3 探索最小鉴别浓度 Maier 等^[25]通过在血培养瓶中接种细菌或酵母的方法探索 MALDI-TOF MS 可以直接鉴定血培养标本中的最低浓度。使用 MALDI-TOF MS 质谱仪联合 Biotyper 软件对标本进行鉴定,可以鉴别浓度为 10^7 CFU/mL 或以上的标本。对于不同种类的细菌(大肠杆菌、革兰阴性非发酵菌、葡萄球菌、肠球菌、链球菌、嗜血杆菌)均能可靠鉴定。先前文献报道的不能检测酵母菌的情况在研究中显示可以鉴定。在某些情况下,甚至有可能在血培养阳性报警 1~2 h 前准确鉴定,显示出较高的灵敏度。但在大多数情况下,混合培养的病原因仍然不能鉴别或只有一种鉴别结果。

4.4 比较延迟检测的影响 Schieffer 等^[26]采用 MALDI-TOF MS 联合 Sepsityper 试剂盒通过延迟对血培养阳性标本处理的办法,模拟在室温条件下可否将标本送到另一个实验室进行检测。试验表明,延迟对血培养阳性标本的处理没有影响 Sepsityper 提取标本或 MALDI-TOF MS 对血培养阳性标本直接鉴定的准确性。研究表明在临床上,可以在室温下将标本送到另外的实验室进行检测。

5 前景与展望

作为一种新兴的诊断方法,MALDI-TOF MS 技术在国外正在推广,而在国内的应用还不是非常广泛。从文献报道的情况来看,对各种标本的预处理和操作流程缺乏统一的规范,对菌种鉴定的准确性缺乏统一的意见。像其他新兴的诊断技术一样,MALDI-TOF MS 不能完全取代手工方法和传统技术对于病原菌的鉴定。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。直接鉴定血培养阳性标本带来的时间效益已是不争的事实,对于临床治疗的重要性的带来的经济效益已在研究之中。对于临床上遇到的一些苛养菌或是罕见的致病菌,MALDI-TOF MS 的引入可以方便快捷地进行鉴定。如 Holler 等^[27]在 2011 年报道了 1 例软弱贫血菌导致的心内膜炎,此后,陆续有文献报道了类鼻疽伯克菌^[28]、纽氏放线菌^[29]、涅斯捷连科菌^[30]、香港鸥杆菌^[31]、贪铜菌^[32]等导致的菌血症。这对在临床工作中一些常规方法不能鉴定的病原菌标本提供了新的思路。目前,MALDI-TOF MS 在细菌耐药性直接检测的功能已经崭露头角,对混合细菌的检测也有望成为现实。相信随着数据库的不断完善、软件的不断更新、影响因素的不断明确,MALDI-TOF MS 可以为临床提供更快、更准的信息,为临床医疗提供参考。

参考文献

- [1] Westh H, Lisby G, Breyse F, et al. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis[J]. Clin Microbiol Infect, 2009, 15(6): 544-551.
- [2] La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry[J]. PLoS ONE, 2009, 4(11): e8041.
- [3] Romero-Gomez MP, Gomez-Gil R, Pano-Pardo JR, et al. Identification and susceptibility testing of microorganism by direct inoculation from positive blood culture bottles by combining MALDI-TOF and Vitek-2 compact is rapid and effective[J]. J Infect, 2012, 65(6): 513-520.
- [4] Meex C, Neuville F, Descy J, et al. Direct identification of bacteria from BacT/ALERT anaerobic positive blood cultures by MALDI-TOF MS: MALDI Sepsityper kit versus an in-house saponin method for bacterial extraction[J]. J Med Microbiol, 2012, 61(Pt 11): 1511-1516.
- [5] Dupont C, Sivadon-Tardy V, Bille E, et al. Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems[J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(7): 998-1004.
- [6] Kilic A, Baysallar M. Identification of staphylococci directly from positive blood culture bottles by MALDI-TOF MS system[J]. Mikrobiyol, Bul, 2014, 48(3): 377-384.
- [7] Lopez RP, Sanchez CC, Marin M, et al. Value of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight for routine identification of viridans group streptococci causing bloodstream infections[J]. Clin Microbiol Infect, 2013, 19(5): 438-444.
- [8] Justesen US, Holm A, Knudsen E, et al. Preliminary results from a comparison of two matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) systems with 16S rRNA gene sequencing for identification of anaerobic bacteria to the species level[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(4): S66.
- [9] Bess DE, Solecki O, Sifr E, et al. Identification of Campylobacter species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(11): 1735-1739.
- [10] Chen JHK, Ho PL, Kwan GSW, et al. Direct bacterial identification in positive blood cultures by use of two commercial matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(6): 1733-1739.
- [11] Marinach-Patrice C, Fekkar A, Atanasova R, et al. Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry[J]. PLoS ONE, 2010, 5(1): e8862.
- [12] Yan Y, He Y, Maier T, et al. Improved identification of yeast species directly from positive blood culture media by combining sepsityper specimen processing and microflex analysis with the matrix-assisted laser desorption ionization biotyper system[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(7): 2528-2532.
- [13] Spanu T, Posteraro B, Fiori B, et al. Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of Candida species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(1): 176-179.
- [14] Yaman G, Akyar I, Can S. Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of Candida strains isolated from blood cultures[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012, 73(1): 65-67.
- [15] Demarco ML, Ford BA. Beyond Identification: emerging and future uses for MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory[J]. Clin Lab Med, 2013, 33(3): 611-628.
- [16] Neumaier M, Grundt A, Findeisen P, et al. Development of a new LC/MS/MS method for rapid detection of ampicillin resistance in escherichia coli[J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 49(10): 3-4.
- [17] Sparbier K, Weller U, Schubert S, et al. MALDI-TOF MS for functional detection of ss-lactam resistance of positive blood cultures[J]. Int J Med Microbiol, 2011, 301(S1): 1-5.
- [18] Oviano M, Fernandez B, Fernandez A, et al. Rapid detection of enterobacteriaceae producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(11): 1146-1157.
- [19] Carvalhaes CG, Cayo R, Visconde MF, et al. Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision[J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69(8): 2132-2136.
- [20] Glans H, Claesson B, Backhaus E. MALDI-TOF-To early goal-directed antibiotic treatment[J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(3): 789-790.
- [21] Hodiamont C, Gouliouris T, Rozemeijer W, et al. Direct identification of micro-organisms in positive blood cultures using MALDI-TOF MS: consequences for advice on antibiotic therapy[J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(3): 683-686.
- [22] Clerc O, Prod'Hom G, Vogne C, et al. Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with gram-negative bacteremia: a prospective observational study[J]. Clin Infect Dis, 2013, 56(8): 1101-1107.
- [23] Saffert RT, Cunningham SA, Mandrekas J, et al. Comparison of three preparatory methods for(下转第 2809 页)

能力和素养,如终身学习能力、分析问题和临床推理能力、批判性思维能力、沟通交流能力、信息管理能力以及团队合作能力等^[3]。这为今后临床工作奠定坚实的基础。

PBL 教学耗费时间多这是普遍存在的情况,在学生和教师上课前的准备,以及病例设计和问题设计上,各个环节均会影响授课时间,只有合理地掌控好各环节才能够将效率最大化,这对教师来说也是一个挑战^[9]。同时,在联合教学中,教师经验不足,缺少引导;部分学生过于功利,只关心考试成绩,未能积极投入病例讨论之中;缺乏联合教学对应教材;教学资源配置不足等这些都直接影响学生学习态度和学习效果。

总之,联合教学作为一种新型的教学方法,与传统教学相比得到了学生的认可,让学生在学习上有了更大的收获。联合教学不仅注重学生独立解决问题的能力,调动学生的主动性和能动性,着重培养学生的团队合作能力和创新意识,同时,也是对教师提出更高的要求,有利于加强教师的综合素质,对培养更多的高素质医学人才奠定基础。联合教学在我国依旧处于初期阶段,还有很多不足,还需有在今后实践中不断探索和改进。

参考文献

- [1] 郭晓晶,赵艳芳,吴骋,等.国内医学统计学 PBL 教学效果的系统评价与 Meta 分析[J].中华医学教育探索杂志,2014,13(1):26-30.
- [2] O'Neill PA. The role of basic sciences in a problem-based learning clinical curriculum[J]. Med Educ, 2000, 34(8): 608-613.
- [3] 李丹,黄绍平,肖延风,等. PBL 教学方法在儿科血液系统疾病见习中的应用[J]. 中国高等医学教育, 2010(8): 104-105.

- [4] 陈方方,李贺. 病例导入式教学在神经病学临床示教教学中的应用[J]. 中国伤残医学, 2013, 21(6): 404-405.
- [5] 余倩. 传统教学模式和 PBL 结合在食品微生物学教学中的思考与实践[J]. 安徽农学通报, 2014, 20(9): 156-157.
- [6] 李潇,李会颖,卢建华. 临床医学七年制专业学生对 PBL 教学的反馈意见调查与分析[J]. 中华医学教育探索杂志, 2014, 13(4): 429-432.
- [7] 刘耀,张曦,陈幸华,等. PBL 教学法在血液内科临床见习教学中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(11): 1253-1254.
- [8] 林霞,金波,谢英,等. “PBL-案例-传统整合教学法”在临床法医学教学中的应用探索[J]. 川北医学院学报, 2010, 25(4): 390-392.
- [9] 邢海燕,王建华,谈荣梅,等. PBL 教学法在医学统计学教学中的 SWOT 分析[J]. 中国高等医学教育, 2010(7): 124-125.
- [10] 陈璐,迪丽娜孜·阿不来提,王欢. CBL 和 PBL 教学方法综合应用于血液内科见习中的探索[J]. 新疆中医药, 2011, 29(4): 84-87.
- [11] 李文燕,仇锦波. 大学生睡眠状况调查分析[J]. 学理论, 2013, 55(36): 210-211.
- [12] 牛君霞,张继平. 高等教育大众化进程中部分大学生在学习方面存在的问题、原因及对策研究[J]. 高等教育研究, 2013, 30(4): 6-8.
- [13] 梁燕,汪青,钱睿哲,等. 从学生的视角看 PBL 教学实践的效果和努力方向[J]. 复旦教育论坛, 2009, 7(4): 92-96.

(收稿日期:2015-02-25 修回日期:2015-04-21)

(上接第 2804 页)

- detection of bacteremia by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012, 73(1): 21-26.
- [24] Wenzel T, Klepel S, Maier T, et al. Automated detection of mixed cultures of micro-organisms using MALDI-TOF MS[J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(2): 526-528.
- [25] Maier T, Wegemann B, Schubert S, et al. Fundamental improved sample preparation technique for direct and fast analysis of positive blood cultures[J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(2): 119-120.
- [26] Schieffer KM, Tan KE, Stamper PD, et al. Multicenter evaluation of the Sepsityper(trademark) extraction kit and MALDI-TOF MS for direct identification of positive blood culture isolates using the BD BACTEC(trademark) FX and VersaTREK (registered trademark) diagnostic blood culture systems[J]. J Appl Microbiol, 2014, 116(4): 939-941.
- [27] Holler JG, Pedersen LK, Calum H, et al. Using MALDI-TOF mass spectrometry as a rapid and accurate diagnostic tool in infective endocarditis: a case report of a patient with mitral valve infective endocarditis caused by Abiotrophia defectiva [J]. Scand J Infect Dis, 2011, 43(3): 234-237.

- [28] Inglis TJJ, Healy PE, Fremlin LJ, et al. Short report: use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis for rapid confirmation of burkholderia pseudomallei in septicemic melioidosis [J]. Am J Trop Med Hyg, 2012, 86(6): 1039-1042.
- [29] De Vreese K, Verhaegen J. Identification of coryneform actinomycetes neuii by MALDI-TOF MS: 5 case reports and review of literature[J]. Acta Clin Belg Acta Clinica Belgica, 2013, 68(3): 210-214.
- [30] Wareham D, Phee L, Hornsey M. Isolation and characterization of a novel Nesterenkonia species from a human bloodstream infection[J]. Int J Antimicrob Agents, 2013, 42(2): 141-142.
- [31] Tse CW, Curreem SO, Cheung I, et al. A novel MLST sequence type discovered in the first fatal case of Lariobacter hongkongensis bacteremia clusters with the sequence types of other human isolates[J]. Emerg Microb Infect, 2014, 3(6): e41.
- [32] D Inzeo T, Santangelo R, Fiori B, et al. Catheter-related bacteremia by Cupriavidus metallidurans [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2015, 81(1): 9-12.

(收稿日期:2015-03-16 修回日期:2015-04-12)