

实验室诊断技术研究专题·论著 DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.18.004

MALDI-TOF MS 检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌及其表型的临床应用研究

李翔^{1,4}, 李慧铭², 刘正祥³, 李凯³, 伏建峰^{3△}

1. 新疆医科大学研究生院, 新疆乌鲁木齐 830000; 2. 新疆军区总医院消毒供应科, 新疆乌鲁木齐 830000;

3. 新疆军区总医院全军临床检验诊断中心, 新疆乌鲁木齐 830000; 4. 新疆生产建设兵团

第十三师哈密红星医院检验科, 新疆哈密 839000

摘要:目的 评估基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌及其表型的临床应用可行性。方法 收集已知基因型别的对碳青霉烯类抗菌药物耐药的肠杆菌科细菌 20 株、对碳青霉烯类抗菌药物敏感的肠杆菌科细菌 40 株, 分别采用传统方法、MALDI-TOF MS 和 PCR 进行检测, 之后行统计学分析, 评估 3 种方法检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌和表型的效能。结果 碳青霉烯类抗菌药物耐药和敏感菌株检测, 传统方法检测符合率为 93.3%(56/60)、MALDI-TOF MS 为 98.3%(59/60)、PCR 为 100.0%(60/60), 经 Fisher 精确检验分析, MALDI-TOF MS 与其他两种方法的检测效能差异无统计学意义($P>0.05$); 产碳青霉烯酶细菌表型检测, 传统方法符合率为 75.0%(15/20), MALDI-TOF MS 符合率为 95.0%(19/20)、PCR 符合率为 100.0%(20/20), MALDI-TOF MS 与其他两种方法的检测效能差异也无统计学意义($P>0.05$), 但 MALDI-TOF MS 方法可大幅缩短检测时程, 可较传统方法提早 17~27 h 出具检验报告, 可较 PCR 检测提早 3~4 h 出具结果。结论 MALDI-TOF MS 检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌及其表型的效能与传统方法和 PCR 相当, 但检测时程大幅缩短, 可提早出具耐药检测报告, 利于感染性疾病的早期诊疗。

关键词:基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱; 碳青霉烯酶; 肠杆菌科; 亚胺培南**中图分类号:**R446.5**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2020)18-2604-06**开放科学(资源服务)标识码(OSID):**

Clinical application of MALDI-TOF MS in detecting carbapenemase-producing enterobacteriaceae and phenotypes

LI Xiang^{1,4}, LI Huiming², LIU Zhengxiang³, LI Kai³, FU Jianfeng^{3△}

1. Graduate School of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830000, China; 2. Department of

Disinfection and Supply, General Hospital of Xinjiang Military Region, Urumqi, Xinjiang

830000, China; 3. Clinical Laboratory Diagnostic Center, General Hospital of Xinjiang Military Region,

Urumqi, Xinjiang 830000, China; 4. Department of Clinical Laboratory, Hami Red

Star Hospital, Thirteenth Division of Xinjiang Production and Construction Corps,

Hami, Xinjiang 839000, China

Abstract: **Objective** To evaluate the clinical application feasibility of MALDI-TOF MS in detecting carbapenemase-producing enterobacteriaceae bacteria and phenotype. **Methods** Twenty strains of known types of enterobacter bacteria resistant to carbapenem antibiotics and 40 strains of enterobacter bacteria sensitive to carbapenem antibiotics were collected. The traditional method, MALDI-TOF MS and PCR methods were used for conducting the detection respectively, and then statistical analysis was performed to evaluate the efficiency of the three methods for detecting carbapenemase-producing enterobacteriaceae bacteria and phenotypes. **Results** In the detection of carbapenem antibiotic-resistant and sensitive strains, the detection coincidence rate of traditional methods was 93.3% (56/60), which of MALDI-TOF MS was 98.3% (59/60), and which of PCR was 100.0% (60/60). After the Fisher exact test analysis, there was no statistical difference in detection efficiency between MALDI-TOF MS and the other two methods ($P>0.05$); in the phenotypic detection of carbapenemase-producing bacteria, the detection coincidence rate of traditional methods was 75.0% (15/20), which of MALDI-TOF MS was 95.0% (19/20) and which of PCR was 100.0% (20/20). The detection efficiency of MALDI-TOF MS was not statistically different from those of the other two methods ($P>0.05$). But the MALDI-TOF MS method could greatly shorten the detection time and issued an inspection report ear-

lier than the traditional method by 17–27 h and PCR by 3~4 h. **Conclusion** The efficiency of MALDI-TOF MS in detecting carbapenemase-producing enterobacteriaceae and phenotype is similar to the traditional method and PCR. The detection time of MALDI-TOF MS is greatly shortened, and could issue the drug resistance test report in advance, which is beneficial to the early diagnosis and treatment of infectious diseases.

Key words: MALDI-TOF MS; carbapenemase; enterobacteriaceae; imipenem

碳青霉烯类抗菌药物是抗菌谱最广、抗菌活性最强的非典型 β -内酰胺类抗菌药物,因其具有官能团结构稳定以及不良反应小等特点,已经成为治疗严重细菌感染的主要抗菌药物之一。近年来,随着经验用药模式的流行,不合理使用抗菌药物成为临床工作中的频发事件,导致耐药、多重耐药菌株呈逐年上升趋势,严重制约和影响感染性疾病患者的有效治疗^[1-3]。因此,依据临床耐药检测数据,合理选择有效的抗菌药物,可能更能满足临床感染性疾病治疗所需。

传统的产碳青霉烯酶细菌和表型的检测采用改良 Hodge 试验、Carba NP 和碳青霉烯灭活试验(CIM)等手工、半自动检测方法,费时费力;分子生物学检测(如 PCR、二代测序等),操作难度大、质量保证体系难以维系、检测平台数据不一致,也不利于临床推广和普及。基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)利于保持待测蛋白质片段的完整性,特别适用于混合物及各种分子质量生物样品的测定,具有精准、快速的特点^[4]。基于临床抗感染治疗现状,也基于对 MALDI-TOF MS 技术的认知,并结合前期预实验结果,本研究拟采用 MALDI-TOF MS 技术检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌及其表型,以利于及时、有效地提供与碳青霉烯类抗菌药物耐药性相关联的临床检验数据,旨在为临床快速、合理、有效地选择抗菌药物提供参考依据,进而为感染性疾病患者得到及时、有效的治疗提供支持。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 选取新疆军区总医院微生物室自 2014—2019 年临床标本分离的对碳青霉烯类抗菌药物耐药的肠杆菌科细菌 20 株、对碳青霉烯类抗菌药物敏感的肠杆菌科细菌 40 株,剔除同一患者重复分离菌株;前期经耐药基因检测^[5],确定含有碳青霉烯酶如下:丝氨酸碳青霉烯酶 10 株、金属 β -内酰胺酶 6 株、苯唑西林酶 1 株,丝氨酸和金属 β -内酰胺酶混合型 3 株,NDM-1 阳性对照菌株为实验室保存菌株,以大肠埃希菌 ATCC25922 为阴性对照菌株。

1.2 主要仪器及试剂 MALDI-TOF MS 仪(江苏天瑞)、全自动细菌鉴定药敏系统和比浊仪(法国生物梅里埃公司)、实时荧光 PCR 检测仪(罗氏 480z)、电子天平(德国赛利多斯公司)、恒温孵育箱(上海一恒科学仪器有限公司)、高速离心机(中科中佳科学仪器有限公司)、亚胺培南药敏纸片(英国 Oxoid 公司)、 α -

氰基-4-羟基肉桂酸 HCCA(法国生物梅里埃公司)、3-氨基苯硼酸(上海麦克林生物技术有限公司)、EDTA- Na_2 (北京索莱宝科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细菌药敏检测 所有菌株鉴定及药敏试验均使用法国生物梅里埃公司 VITEK 2 Compact 及其配套 GN16 药敏卡进行鉴定,以大肠埃希菌 ATCC25922 为质控菌株,以亚胺培南为碳青霉烯类抗菌药物观测或研究对象(预实验确定);采用纸片扩散法(K-B 法)复核亚胺培南 MIC 值,重新确认菌株是否对亚胺培南敏感或耐药,药敏结果的判读按照美国临床和实验室标准化协会(CLSI) M100 2019 年标准进行。

1.3.2 传统方法检测

1.3.2.1 简化碳青霉烯酶灭活试验(sCIM) 挑取单个待测菌落,在 2 mL TSB 中乳化,旋涡振荡 10~15 s,将亚胺培南药敏纸片加到每个菌悬液 TSB 管中,35 °C 孵育 4 h;将大肠埃希菌 ATCC25922 配置成 0.5 麦氏浊度菌悬液,均匀涂布于 M-H 琼脂平板上;将 TSB 中亚胺培南药敏纸片捞出,贴于已经接种好指示菌的 M-H 平板表面,35 °C 孵育 18~24 h 后,观察结果,结果依据 CLSI M100 2019 年标准判定。

1.3.2.2 纸片抑制增效试验(DSST) 将 3-氨基苯硼酸(APBA)、EDTA- Na_2 滴于亚胺培南药敏纸片上,分别制成亚胺培南/APBA(10 μg /500 μg)纸片、亚胺培南/EDTA- Na_2 (10 μg /2 μmol)纸片、亚胺培南/APBA+EDTA- Na_2 (10 μg /250 μg +1 μmol)纸片;将 0.5 麦氏浊度的待测菌悬液均匀涂布在 MH 琼脂平板上,分别贴上亚胺培南和复合药敏纸片,35 °C 孵育 16~18 h 后,测量抑菌圈,以复合纸片与单药纸片的抑菌圈之差 ≥ 5 mm 为阳性,观察结果。

1.3.3 PCR 基因检测

1.3.3.1 待测菌核酸提取 待测标本接种至血培养,37 °C 过夜培养,挑取纯化菌落配置成 0.5 麦氏浊度菌悬液,取 1.5 mL 菌悬液,高速离心后取菌体沉淀,使用细菌基因组提取试剂盒提取基因组,-20 °C 保存备用。

1.3.3.2 PCR 基因引物 扩增包括 7 种碳青霉烯酶基因(blaKPC、blaNDM、blaSME、blaIMI、blaVIM、blaIMP 和 blaOXA-),PCR 引物由新疆子琦生物有限公司委托北京博迈德基因技术有限公司合成,具体引

物序列见表 1。

水 6.2 μL, 细菌 DNA 模板 3 μL, 上游引物 0.4 μL, 下游引物 0.4 μL, 2×qPCR SuperMix 10 μL。

1.3.3.3 PCR 反应体系 反应体系为 20 μL。双蒸

表 1 PCR 基因引物序列

靶基因	引物名称	引物序列(5′-3′)	片段大小(bp)
blaSME	SME-F	GAGGAAGACTTTTGATGGGAGGAT	830
	SME-R	TCCCCTCAGGACCGCCAAG	
blaIMI	IMI-F	GGTGTCTACGCTTTAGACACTGGCTC	536
	IMI-R	GCACGAATACGCGCTGCACCGG	
blaKPC	KPC-F	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	893
	KPC-R	TTTTTCAGAGCCTTACTGCCC	
blaNDM	NDM-F	GGTTTGCGCATCTGGTTTTTC	621
	NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC	
blaVIM	VIM-F	GATGGTGTTTTGGTCGCATA	390
	VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG	
blaIMP	IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTC	232
	IMP-R	TCGGTTTAAYAAAACAACCACC	
blaOXA-	OXA-48-F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	744
	OXA-48-R	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	

1.3.3.4 PCR 循环条件 (1)预变性:94 ℃ 30 s;(2)循环:94 ℃ 5 s,50~60 ℃15 s,72 ℃ 10s, 40~45 个循环;(3)延伸:72 ℃ 10 s。

1.3.4 MALDI-TOF MS 方法检测

1.3.4.1 内部校准 HCCA 基质进行内部校准,参考峰值为 130.6 m/z、233.1 m/z、397.5 m/z、524.9 m/z、651.0 m/z、776.1 m/z 和 901.8 m/z,每个 m/z 峰最大偏差不超过±5 m/z,则视为校准合格。

1.3.4.2 菌悬液与亚胺培南混合液的制备 将待测菌落配制成 2 麦氏浊度菌悬液,将亚胺培南药敏纸片配制成 0.1 mg/mL,分别取 20 μL 菌悬液(2 McF)与 20 μL 亚胺培南(0.1 mg/mL)进行等体积混合,35 ℃ 孵育 60 min,12 000 r/min 离心 3 min,备用。

1.3.4.3 菌悬液、亚胺培南及抑制剂混合液的制备 将 2 McF 菌悬液 20 μL 与 0.1 mg/mL 亚胺培南 20 μL 混合,混合液中分别加入 4 mg/mL 抑制剂(APBA 和 EDTA-Na₂)20 μL,保持总反应体积为 60 μL,35℃孵育 60 min,12 000 r/min 离心 3 min,备用。

1.3.4.4 MALDI-TOF MS 检测亚胺培南及 1.3.4.2 和 1.3.4.3 所制备产物 标准溶液:500 μL 乙腈+475 μL 水+25 μL 三氟乙酸;基质溶液:HCCA 粉末 2.5 mg+250 μL 标准溶液充分溶解;质谱参数:MCP 电源 1 400 V、靶高压电源 18 800 V、脉冲高压电源 1 320 V、脉冲延时 510 ns、激光强度 11%、质谱范围 1~1 000 m/z。取 1 μL 待测液涂钢制靶板,待干燥后,加入 1 μL 基质液(HCCA),干燥后上质谱检测,手动选点,选取至少 6 点,累计 240 张激光照,观察质

谱图,纳入条件为单个质量峰大于 1 000 离子流强度。亚胺培南的特征峰在 299 m/z 处^[6],将待测菌与亚胺培南共同孵育一定时间后,行 MALDI-TOF MS 检测,观察共同孵育前后抗菌药物的质谱图变化,若出现原有特征峰的锐减或消失,并伴水解产物的生成,则提示待测菌产碳青霉烯酶。基于产丝氨酸碳青霉烯酶细菌可以被 3-氨基苯硼酸化合物抑制而不被 EDTA 抑制,产金属 β-内酰胺酶细菌可以被 EDTA-Na₂ 抑制但不被硼酸化合物所抑制的原理,分别在 MALDI-TOF 反应体系中添加 3-氨基苯硼酸和 EDTA-Na₂,将待测菌与亚胺培南共同孵育 60 min 后,观测特征质谱峰的变化,以此检测区分产碳青霉烯酶细菌表型^[7]。

1.4 统计学处理 使用 SPSS17.0 统计软件,计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 药敏复核检测 20 株碳青霉烯类抗菌药物耐药菌株的亚胺培南 MIC 值均≥4,经纸片扩散法(K-B 法)复核检测,复核率为 100.0%,具体如表 2。

2.2 传统检测方法

2.2.1 sCIM 实验 结果显示,其检测产碳青霉烯酶细菌的灵敏度为 90.0%、特异度为 95.0%、符合率为 93.3%(56/60),以上结果根据(CLSI M100) 2019 标准进行判读。

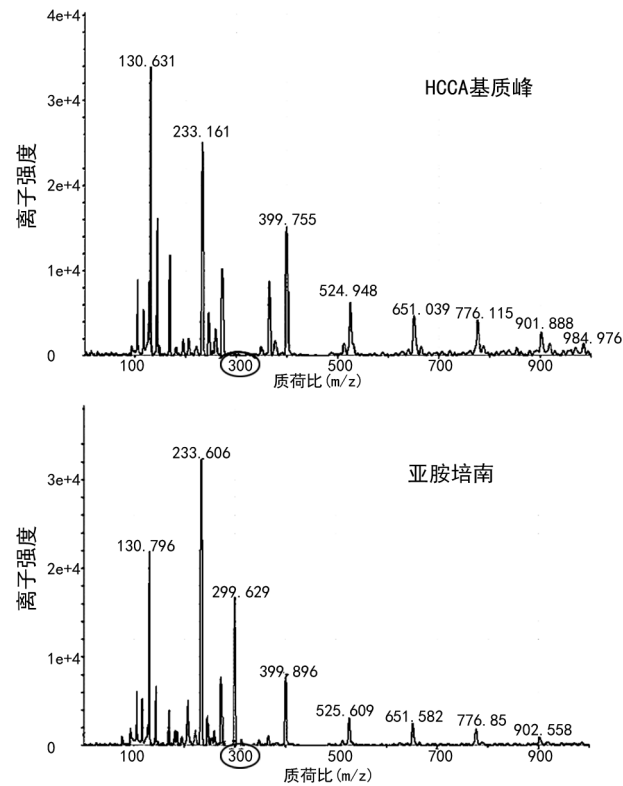
2.2.2 DSST 实验 结果显示,检测出产丝氨酸碳青霉烯酶 8 株(G1、G3、G5~7、G18~20)、产金属 β-内

酰胺酶 6 株(G2、G8~11、G13)、混合型 1 株(G14),5 表型区分符合率为 75.0%(15/20)。株无法判定产何种碳青霉烯酶(G4、G12、G15~17),

表 2 已知表型耐药菌株亚胺培南药敏结果

编号	菌种	亚胺培南 MIC($\mu\text{g/mL}$)	已知携带碳青霉烯酶		
			丝氨酸碳青霉烯酶	金属 β -内酰胺酶	苯唑西林酶
G1	肺炎克雷伯菌	>16	+	—	—
G2	肺炎克雷伯菌	>16	—	+	—
G3	肺炎克雷伯菌	>16	+	—	—
G4	肺炎克雷伯菌	>16	+	+	—
G5	肺炎克雷伯菌	>16	+	—	—
G6	肺炎克雷伯菌	>16	+	—	—
G7	肺炎克雷伯菌	>16	+	—	—
G8	肺炎克雷伯菌	>16	—	+	—
G9	肺炎克雷伯菌	4	—	+	—
G10	肺炎克雷伯菌	4	—	+	—
G11	肺炎克雷伯菌	4	—	+	—
G12	肺炎克雷伯菌	>16	+	—	—
G13	大肠埃希菌	>16	—	+	—
G14	肺炎克雷伯菌	>16	+	+	—
G15	肺炎克雷伯菌	>16	—	—	+
G16	大肠埃希菌	>16	+	+	—
G17	肺炎克雷伯菌	>16	+	—	—
G18	肺炎克雷伯菌	4	+	—	—
G19	肺炎克雷伯菌	>16	+	—	—
G20	肺炎克雷伯菌	>16	+	—	—

注: + 代表阳性, — 代表阴性。



注:图中圈的数据代表亚胺培南质量峰(299.36±1)m/z 所在位置。

图 1 HCCA 基质峰及亚胺培南特征峰

2.3 PCR 检测 PCR 共检测出 KPC-2 型 10 株、NDM-1 型 6 株、KPC 和 NDM 共有型 2 株(G14)、OXA-48 型 1 株,符合率为 100.0%。

2.4 MALDI-TOF MS 检测

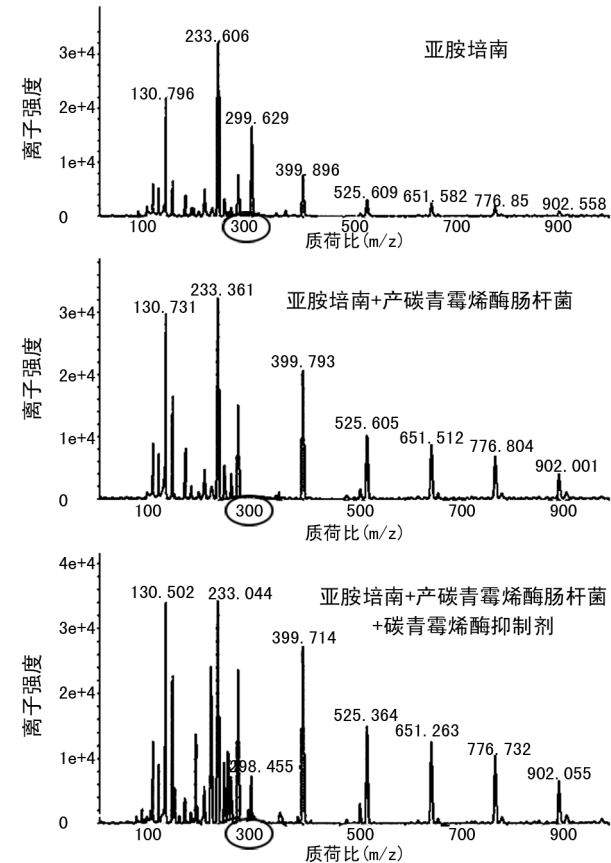
2.4.1 产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌检测 结果显示,待测菌与亚胺培南共同孵育 60 min 后,行 MALDI-TOF MS 检测,产碳青霉烯酶肠杆菌的检出率为 98.3%(59/60),检测的灵敏度为 95.0%、特异度为 100.0%。见图 1。

2.4.2 产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌表型区分检测 结果显示,检测出产丝氨酸碳青霉烯酶 10 株,产金属 β -内酰胺酶 6 株,混合型 3 株,表型检测符合率为 95.0%(19/20)。见图 2。

2.5 MALDI-TOF MS 的检测效能评估

2.5.1 MALDI-TOF MS 方法检测产碳青霉烯酶肠杆菌效能进行评估 对传统方法、MALDI-TOF MS 和 PCR 检测产碳青霉烯酶的效能行统计学分析,结果显示传统方法检测符合率为 93.3%(56/60),MALDI-TOF MS 为 98.3%(59/60),PCR 为 100.0%(60/60),分别经 Fisher 精确检验分析,3 种方法在检测产碳青霉烯酶细菌效能上差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3;在检测时程方面,与传统方法比较,MALDI-TOF

MS 可提早 27 h 出具检验报告,与 PCR 比较可提早 4 h 出具结果。



注:图中圈的数据代表亚胺培南质量峰(299.36±1)m/z 所在位置,质量峰(299.36±1)m/z 消失说明亚胺培南被产碳青霉烯酶肠杆菌水解,药效失活;质量峰(299.36±1)m/z 出现说明抑制剂抑制产碳青霉烯酶细菌,亚胺培南未被水解,药效未失活。

图 2 亚胺培南、产碳青霉烯酶肠杆菌和表型抑制剂混合孵育后行 MALDI-TOF MS 检测比较图

表 3 3 种方法检测产碳青霉烯酶肠杆菌效能比较						
方法	碳青霉烯酶肠杆菌(n)		符合率 (%)	灵敏度 (%)	特异度 (%)	
	+	-				
传统方法	+	18	2	93.3	90.0	95.0
	-	2	38			
MALDI-TOF MS	+	19	0	98.3	95.0	100.0
	-	1	40			
PCR	+	20	0	100.0	100.0	100.0
	-	0	40			

注: + 表示阳性; - 表示阴性。

2.5.2 MALDI-TOF MS 方法检测碳青霉烯酶表型效能评估 20 株不同基因型别的产碳青霉烯酶肠杆菌,传统方法检测符合率为 75.0%(15/20)、MALDI-TOF MS 符合率为 95.0%(19/20)、PCR 符合率为 100.0%(20/20),传统方法、PCR 和 MALDI-TOF MS 检测差异无统计学意义($P>0.05$);在检测时程方面,MALDI-TOF MS 可较传统方法提早 17 h 出具

检验报告,比 PCR 提前 3 h。见表 4。

表 4 3 种方法检测碳青霉烯酶不同表型检出符合率比较

组别	碳青霉烯酶不同表型(n)		合计 (n)	符合率 (%)
	检出	未检出		
传统方法	15	5	20	75.0
MALDI-TOF MS	19	1	20	95.0
PCR	20	0	20	100.0

3 讨 论

MALDI-TOF MS 因其具有高灵敏度、分析速度快、分辨率高等特点,特别是近年来在基因分型分析、病原体鉴定、质谱成像等应用的发展,已成为目前微生物鉴定工作中重要的组成部分,2012 年获中国 CFDA 批准,2013 年获美国 FDA 批准,微生物临床检验已经进入质谱时代。本研究以临床常用的碳青霉烯类抗菌药物为观察对象,评估 MALDI-TOF MS 在病原菌耐药性检测方面应用的可行性。业已证实,碳青霉烯耐药菌所产碳青霉烯酶,可作用于碳青霉烯类抗菌药物的官能团,即 β -内酰胺环,通过水解作用,打开酰胺键,使 β -内酰胺环开放,致使抗菌药物官能团结构稳定性受损,进而致药效失活,被认为是病原菌对碳青霉烯类抗菌药物产生耐药性的主要机制。基于以上认知,本研究将待测菌与碳青霉烯类抗菌药物共同孵育,之后行 MALDI-TOF MS 检测,观察共同孵育前后抗菌药物的质谱图 m/z 的变化,如果待测菌对抗菌药物耐药,则可出现原有特征峰的锐减或消失;理想的条件下,还可伴有新产物的生成。

前期实验中,本课题组遴选碳青霉烯类抗菌药物代表性药物厄他培南 475.5 m/z、亚胺培南 299.36 m/z 和美罗培南 383.46 m/z 为初步观测对象。预试验结果显示,美罗培南质谱特征峰在 383 m/z 处,与基质峰 398 m/z 接近,检测易受干扰;厄他培南质谱峰多而杂,增加实验判断难度;与前两者相比,亚胺培南特征峰在 299 m/z 处,峰形为清晰的单峰,因此,选择亚胺培南为下一步观测研究的对象^[8]。将待测菌与亚胺培南共同孵育 60 min 后,行 MALDI-TOF MS 检测,以亚胺培南特征峰的锐减或消失为评判指标。结果显示,产碳青霉烯酶肠杆菌的检出率、灵敏度和特异度分别为 98.3%、95.0% 和 100.0%;检测时限比传统方法上提早 27 h,比 PCR 提早 4 h。实验过程中,未观测到水解产物峰的出现,分析原因,可能与反应体系的组成和水解产物不易捕获有关。SPARBI-ER 等^[9]的研究也出现类似情况,该项研究认为未观测到水解产物峰系实验环境、反应体系 pH、实验材料及其浓度选择等因素所致。

如前所述,碳青霉烯酶是指能够水解碳青霉烯类抗菌药物的 β -内酰胺酶,其可随细菌胞体内氨基酸位

点的位移而产生出不同的表型,每种表型的耐药特点、细菌分布、暴发流行趋势和临床治疗用药方案各不相同,因此,耐药性细菌表型的检测也是临床合理用药的一项重要实验参考依据。本研究在 MALDI-TOF MS 反应体系中添加 3-氨基苯硼酸和 EDTA- Na_2 ,将待测菌与亚胺培南共同孵育 60 min 后,观测特征质谱峰的变化,以此检测区分产碳青霉烯酶细菌表型。结果显示,传统方法、MALDI-TOF MS 和 PCR 用于表型检测的符合率分别为 75.0%(15/20)、95.0%(19/20)和 100.0%(20/20),检测符合率差异无统计学意义($P>0.05$),但检测时程 MALDI-TOF MS 比传统方法提早 17 h,比 PCR 提前 3 h。因各基因型别的菌株样本量有限,本研究未对具体的型别,如 KPC-2 型、NDM-1 型和 OXA-48 型等的检测效能进行评估和分析。

综上所述,传统细菌耐药性检测方法费时、费力;PCR 操作难度大,质量不统一,难以满足临床快速检测并出具病原菌耐药检测结果的需求。MALDI-TOF MS 技术的应用虽尚处于探索研究阶段,但其快速、精准的特点已被各国研究者接受,并达成共识。本研究评估了 MALDI-TOF MS 检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌和表型的临床应用可行性,结果显示 MALDI-TOF MS 检测效能与其他两种方法相当,但检测时程大幅缩短,可提前出具耐药检测报告,利于感染性疾病的早期诊疗^[10-12]。当然,本研究涵盖的碳青霉烯酶表型种类和数量有限,如 IMP、SME、VIM、IMI 等表型在本研究中未涉及,OXA 数量少等^[13],加上在产碳青霉烯酶肠杆菌科检测过程中尚难捕获水解产物或代谢产物的生成,表明反应体系的组成和反应条件的选择还需进一步优化、整合和完善^[14]。但以上局限和不足均不影响 MALDI-TOF MS 作为一种快速、有效的病原菌耐药性检测技术在临床的推广应用。

参考文献

- [1] 龚林,刘小丽,许慧琼,等.耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌分子流行病学研究[J].中国感染控制杂志,2019,18(7):643-647.
- [2] 李翠翠,胡同平.碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌的耐药机制研究进展[J].检验医学与临床,2019,16(11):1600-1604.
- [3] 李鑫,杨继勇.碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌分布与流行特征研究进展[J].中华微生物学和免疫学杂志,2019,39(4):306-310.
- [4] 程国平,简雪峰,许德英,等. MALDI-TOF MS 在碳青霉

- 烯耐药肺炎克雷伯菌流行病学分析中的应用[J].南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(1):62-67.
- [5] 刘建华,高婷,刘正祥,等.耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌耐药基因检测及分子特征分析[J].新疆医学,2017,47(12):1352-1355.
- [6] OVIAÑO M,BOU G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the rapid detection of antimicrobial resistance mechanisms and beyond[J]. Clin Microbiol Rev,2019,32(1):1-29.
- [7] 谢小芳,周惠琴,郑毅,等. MALDI-TOF MS 检测肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶的效果评估[J].中华检验医学杂志,2019,42(2):135-139.
- [8] GUTIÉRREZ S,CORREA A,HERNÁNDEZ-GÓMEZ C,et al. Detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: evaluation of the carbapenem inactivation method (CIM) [J]. Enferm Infecc Microbiol Clin,2019,37(10):648-651.
- [9] SPARBIER K,SCHUBERT S,WELLER U,et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics[J]. J Clin Microbiol,2012,50(3):927-937.
- [10] MILTGEN G,PLÉSIAT P,MILLE A,et al. Detection of carbapenemase activity in *Pseudomonas aeruginosa* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) [J]. J Microbiol Methods,2018,145(1):66-68.
- [11] ROTOVA V,PAPAGIANNITSIS C C,SKALOVA A,et al. Comparison of imipenem and meropenem antibiotics for the MALDI-TOF MS detection of carbapenemase activity[J]. J Microbiol Methods,2017,137(1):30-33.
- [12] 冯丽娜,李从荣. MALDI-TOF MS 检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的应用[J].中华微生物学和免疫学杂志,2018,38(3):218-225.
- [13] MAIRI A,PANTEL A,SOTTO A,et al. OXA-48-like carbapenemases producing enterobacteriaceae in different niches[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis,2018,37(4):587-604.
- [14] OVIAÑO M,BOU G. Imipenem-avibactam: a novel combination for the rapid detection of carbapenemase activity in enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Diagn Microbiol Infect Dis,2017,87(2):129-132.

(收稿日期:2020-02-11 修回日期:2020-06-29)