

论著·临床研究

MALDI-TOF MS 在泛耐药肺炎克雷伯菌中的药敏试验的应用评价^{*}

郑光辉^{1,2}, 赵剑北³, 李斯文^{1,2}, 张国军^{1,2,△}

(1. 首都医科大学附属北京天坛医院检验科, 北京 100070; 2. 北京市免疫试剂临床工程技术研究中心, 北京 100070; 3. 首都医科大学临床检验诊断学系, 北京 100070)

摘要:目的 应用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)检测肺炎克雷伯菌的蛋白, 探索利用质谱检测肺炎克雷伯菌的耐药性。方法 收集首都医科大学附属北京天坛医院临床分离的具有不同耐药基因的肺炎克雷伯菌 17 株及野生型肺炎克雷伯菌 11 株, 使用恒温微流控芯片法和 MALDI-TOF MS 分别进行肺炎克雷伯菌的耐药基因检测及蛋白检测, 以获得具有特定耐药基因的特征蛋白指纹图谱。结果 分析菌株的基因型与蛋白指纹图谱, 4 518 m/z 可能与 bla_{KPC} 基因型有关, 灵敏度和特异度分别为 75.00%(8/12) 和 100.00%(5/5); 6 152 m/z 可能与 bla_{CTX-M-9} 基因型有关, 灵敏度和特异度分别为 70.00%(7/10) 和 71.43%(5/7)。结论 应用 MALDI-TOF MS 可以对肺炎克雷伯菌的耐药性进行初步探索, 未来可以辅助临床微生物的耐药性检测。

关键词: 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱; 肺炎克雷伯菌; 耐药

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.24.002 **中图法分类号:**R446.5

文章编号:1673-4130(2019)24-2949-05 **文献标识码:**A

Evaluation of MALDI-TOF MS in antimicrobial sensitivity test of extensive drug resistance *Klebsiella pneumoniae*^{*}

ZHENG Guanghui^{1,2}, ZHAO Jianbei³, LI Siwen^{1,2}, ZHANG Guojun^{1,2,△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100070, China; 2. Beijing Engineering Research Center of Immunological Reagents Clinical Research, Beijing 100070, China; 3. Department of Clinical Laboratory Diagnosis, Capital Medical University, Beijing 100070, China)

Abstract: **Objective** To detect the resistance protein of *Klebsiella pneumoniae* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), and to explore the drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* by mass spectrometry. **Methods** 17 strains of *Klebsiella pneumoniae* and 11 strains of wild type *Klebsiella pneumoniae* with different drug resistance genes isolated from Beijing Tiantan Hospital affiliated to Capital Medical University were collected. The microfluidic chip method and MALDI-TOF MS were used to achieve drug resistance gene detection and protein detection of *Klebsiella pneumoniae* to obtain a characteristic protein fingerprint of a specific drug resistance gene. **Results** The genotype and protein fingerprint of the strain were analyzed. 4 518 m/z may be related to the bla_{KPC} genotype. The sensitivity and specificity were 75.00%(8/12) and 100.00%(5/5), respectively. 6 152 m/z may be related to the bla_{CTX-M-9} genotype. The sensitivity and specificity were 70.00%(7/10) and 71.43%(5/7), respectively, associated with the bla_{CTX-M-9} genotype. **Conclusion** MALDI-TOF MS can be used to explore the drug resistance of *Klebsiella pneumoniae*, and it can assist the detection of antimicrobial sensitivity test of the microorganisms in the future.

Key words: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; *Klebsiella pneumoniae*; resistance

肺炎克雷伯菌是肠杆菌科常见的致病菌^[1], 目前其耐药形势越来越严峻, 对各类抗菌药物耐药率在逐年上升^[1-2]。因此, 及时、快速地进行肺炎克雷伯菌的药敏试验对指导临床抗菌药物的使用和控制院内耐

^{*} 基金项目: 北京市优秀人才青年骨干项目(2017000021469G270)。

作者简介: 郑光辉, 男, 副主任技师, 主要从事临床微生物研究。△ 通信作者, E-mail: tiantanzgj@163.com。

本文引用格式: 郑光辉, 赵剑北, 李斯文, 等. MALDI-TOF MS 在泛耐药肺炎克雷伯菌中的药敏试验的应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(24): 2949-2953.

药菌株的播散均具有重要意义^[3]。目前,临床实验室对肺炎克雷伯菌的耐药性监测仍以纸片扩散法和微量肉汤稀释法为主。由于其原理是基于微生物的代谢反应,虽能基本满足临床需求,但是传统的药敏试验方法耗时较长,阻碍了临床的精准用药^[4]。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)是近年来用于微生物鉴定的有效工具,因具有快速、简便等优点使其在临床微生物鉴定方面得到广泛应用^[3],其在微生物耐药性监测方面也有了一定的报道,利用 MALDI-TOF MS 进行药敏试验可以提前 24 h 完成药敏试验且花费较低^[5]。因此,为解决肺炎克雷伯菌感染的耐药时效性问题,弥补单一方法的片面性和传统方法人工操作繁琐、耗时长等不足,本实验利用 MALDI-TOF MS 分别对比不同耐药表型及基因型的肺炎克雷伯菌进行检测,寻找具有特定耐药基因的特征蛋白的指纹图谱,以达到能够快速对耐药肺炎克雷伯菌进行药敏实验的目的,本研究针对临床上最广泛的基因型作为研究对象,对 MALDI-TOF MS 在肺炎克雷伯菌药敏试验的应用方面做出了探索性研究。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2018 年 3—9 月首都医科大学附属北京天坛医院微生物实验室临床标本分离得到的肺炎克雷伯菌,其中包含不同耐药机制的肺炎克雷伯菌 17 株及野生型肺炎克雷伯菌 11 株。

1.2 仪器与试剂 VITEK MS (生物梅里埃公司,法国)、CO₂ 孵育培养箱(热电公司,美国)、Phoenix 9240 全自动培养系统(碧迪公司,美国),CapitalBio RTisochip-A 恒温扩增检测仪(北京博奥生物有限公司,中国),VITEK MS 靶板(生物梅里埃,法国)、VITEK-MS CHCA 基质液(生物梅里埃,法国)、哥伦比亚血平皿(天津市金章科技发展有限公司,中国)、一次性接种环(科藩公司,意大利)、QIAGEN DNA Kit 试剂盒(凯杰公司,德国)、恒温扩增试剂(北京博奥生物有限公司,中国)。

1.3 菌株培养和鉴定 将利用纸片法保存的菌株从-80℃冰箱中取出,倒入营养肉汤,置于 35℃孵育培养箱中恒温培养 16~24 h 后,转种于哥伦比亚血平皿上,再于 35℃孵育培养箱中恒温培养 16~24 h。采用 SARAMIS RUO 模式菌株进行鉴定,确认其为肺炎克雷伯菌。

1.4 耐药基因检测 采用微流控芯片对细菌的耐药基因进行检测,此项技术基于环介导等温扩增(LAMP)技术进行微生物耐药基因的测定,具体操作方法为抽取 100 μL 脑脊液细菌培养阳性培养液,置于 1.5 mL 无菌离心管中,37℃、12 000 r/min 离心 5 min,弃去上清,提取细菌的核酸。吸取 26 μL 恒温扩增试剂,加入准备好的 200 μL 离心管中,加入 26 μL 被检核酸样品,轻摇使其充分混合均匀,离心至管底。

吸取 50 μL 上述配制好的核酸扩增反应体系,加入到芯片主通道中,待其充满芯片主通道即停止加样,用封口膜封闭出样口。将加样后的芯片固定在低速离心机上,以 6 000 r/min 离心 30 s 后取下。置于 CapitalBio RTisochip-A 恒温扩增检测仪上进行检测。50 min 后得到检测结果。如果样本测试没有结果或产生一个错误,或测试后没有残留 DNA,标本在初始测试 24 h 内重新测试。测试的基因型包括 bla_{KPC}, bla_{SHV}, bla_{TEM}, bla_{CTX-M-9}, ompK35 和 aadA1^[6],其中,耐药基因的序列采用芯片自身的引物序列完成。

1.5 MALDI-TOF MS 检测方法建立 以 CHCA 基质液为基准,参数设置:扫描范围 200~2 000 m/z,激光打点次数 100,激光强度 32 A,以 212.03 和 379.09 m/z 为基峰建立方法;2 000~20 000 m/z 范围以 SARAMIS RUO 模式自带鉴定参考方法为准。

1.6 MALDI-TOF MS 检测 将全部的 17 株耐药肺炎克雷伯菌及 11 株敏感菌使用一次性接种环分别涂于靶板上,同时以 ATCC 8739 大肠埃希菌为质控菌种,检测点及质控点均加入饱和 CHCA 基质液 1 μL,待靶板晾干后应用 MALDI-TOF MS RUO 模式对菌株 200~2 000 m/z 范围进行检测。重复上述步骤,对菌株 2 000~20 000 m/z 范围进行检测,将 Shimadzu Biotech MALDI-MS 软件上得到的峰图使用 SARAMIS Premium 软件进行评分。重复上述检测,直至 SARAMIS Premium 软件对所有菌株的峰图评分得到 90%以上,收集得到的峰图数据。

2 结果

2.1 肺炎克雷伯菌耐药基因结果 17 株耐药肺炎克雷伯菌的基因型微流控芯片检测示意图见图 1,检测基因型见表 1。

2.2 MALDI-TOF MS 结果 使用 Shimadzu Biotech MALDI-MS 软件分析 11 株敏感菌 200~2 000、2 000~20 000 m/z 的质谱峰图,其中在 200~2 000 m/z 范围共筛选出 63 个峰,2 000~20 000 m/z 范围共筛选出 83 个峰,合计共 146 个峰。以±0.05%为偏差范围,在偏差范围以内视为同一峰,依次分析每株耐药菌的质谱峰图,弃去同一离子峰,只记录不同离子峰。记录完成后将敏感菌与耐药菌进行对比,在 200~2 000 及 2 000~20 000 m/z 范围区间内筛选出耐药菌具有的离子峰,同时在敏感菌中不存在的峰,采用灵敏度进行表征,计算方式:灵敏度=耐药株具有某离子峰数目/耐药菌的总数目,结果显示,在 524 m/z,728 m/z 的区分灵敏度最高,均达到 76.47%。将耐药菌根据不同基因型进行分组比对,筛选出 bla_{KPC} 基因型、bla_{CTX-M-9} 基因型及其他基因型可能存在的特异峰,采用灵敏度与特异度表征,其中灵敏度=具备某基因型且具有某离子峰数目/具有某耐药基因的总数目,特异度=不具备某基因且不具备某离子峰数目/不具备某耐药基因的总数目,见表 2。

表 1 耐药肺炎克雷伯菌基因型

菌株名称	碳青霉烯相关基因		ESBLs 相关基因		膜孔蛋白相关基因	氨基糖苷相关基因
肺炎克雷伯菌 3	bla _{KPC}	bla _{SHV}	bla _{TEM}	—	ompK35	aadA1
肺炎克雷伯菌 19	bla _{KPC}	bla _{SHV}	bla _{TEM}	bla _{CTX-M-9}	ompK35	aadA1
肺炎克雷伯菌 20	—	bla _{SHV}	—	—	ompK35	—
肺炎克雷伯菌 23	—	bla _{SHV}	bla _{TEM}	—	ompK35	—
肺炎克雷伯菌 121	—	bla _{SHV}	bla _{TEM}	bla _{CTX-M-9}	ompK35	aadA1
肺炎克雷伯菌 135	—	—	—	—	—	—
肺炎克雷伯菌 173	bla _{KPC}	bla _{SHV}	bla _{TEM}	bla _{CTX-M-9}	ompK35	—
肺炎克雷伯菌 175	bla _{KPC}	bla _{SHV}	bla _{TEM}	bla _{CTX-M-9}	ompK35	—
肺炎克雷伯菌 181	bla _{KPC}	bla _{SHV}	bla _{TEM}	bla _{CTX-M-9}	ompK35	—
肺炎克雷伯菌 195	bla _{KPC}	bla _{SHV}	bla _{TEM}	bla _{CTX-M-9}	ompK35	aadA1
肺炎克雷伯菌 209	—	bla _{SHV}	—	—	ompK35	—
肺炎克雷伯菌 214	bla _{KPC}	bla _{SHV}	—	—	ompK35	aadA1
肺炎克雷伯菌 231	bla _{KPC}	bla _{SHV}	—	bla _{CTX-M-9}	ompK35	—
肺炎克雷伯菌 234	bla _{KPC}	bla _{SHV}	bla _{TEM}	bla _{CTX-M-9}	ompK35	—
肺炎克雷伯菌 238	bla _{KPC}	bla _{SHV}	—	—	ompK35	—
肺炎克雷伯菌 255	bla _{KPC}	bla _{SHV}	bla _{TEM}	bla _{CTX-M-9}	ompK35	—
肺炎克雷伯菌 386	bla _{KPC}	bla _{SHV}	bla _{TEM}	bla _{CTX-M-9}	ompK35	—

注：—表示未检测出该基因

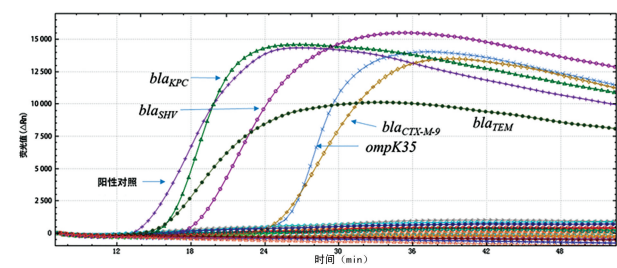


图 1 肺炎克雷伯菌的基因型微流控芯片检测

表 2 不同耐药基因型的特异峰

基因型	峰值(m/z)	灵敏度(%)	特异度(%)
bla _{KPC}	367	66.67	80.00
	882	83.33	60.00
	4 518	75.00	100.00
	6 152	66.67	60.00
	6 594	66.67	60.00
bla _{CTX-M-9}	6 840	75.00	60.00
	367	60.00	57.14
	898	70.00	57.14
	938	60.00	57.14
	4 518	80.00	85.71
bla _{SHV}	6 153	70.00	71.43
	728	81.25	100.00
	882	75.00	100.00
	898	62.50	100.00
	938	56.25	100.00
ompK35	2 957	56.25	100.00
	4 518	56.25	100.00
	6 152	56.25	100.00
	6 840	68.75	100.00
	728	81.25	100.00
	882	75.00	100.00
	898	62.50	100.00

续表 2 不同耐药基因型的特异峰

基因型	峰值(m/z)	灵敏度(%)	特异度(%)
	938	56.25	100.00
	2 957	56.25	100.00
	4 518	56.25	100.00
	6 152	56.25	100.00
	6 840	68.75	100.00
bla _{TEM}	5 923	54.55	83.33
	6 152	63.64	66.67
	7 430	90.91	50.00
	4 924	60.00	75.00
	4 924	60.00	75.00

3 讨 论

肺炎克雷伯菌是临床肠杆菌科细菌重症感染的重要细菌之一^[7],由于近年来肺炎克雷伯菌的耐药率逐年增加,从而导致临床治疗遇到困难。耐药基因的检测可以解决时间长的问题,且可以实施精准用药,目前检测肺炎克雷伯菌耐药基因的方法主要以多重 PCR 为主,操作较为繁琐且假阳性率高,在临床微生物实验室开展难度较大^[8]。MALDI-TOF MS 目前在临床微生物实验室已经成为病原菌鉴定的常规方法,具有快速、简便等特点。通过 SARAMIS Premium 软件中质量图谱与自带数据库的比对,可获得细菌的种属信息,分别对比具有不同耐药基因的微生物质谱数据,可以获取具有特定耐药基因的特定蛋白峰,进而提供药敏数据^[9]。

本研究对比 bla_{KPC} 基因型与无 bla_{KPC} 基因型的菌株,分析发现 4 518 m/z 的峰可能作为 bla_{KPC} 基因型对应的特异峰,其灵敏度可达到 75.00%(8/12),且在非 bla_{KPC} 基因型的耐药菌中均未发现此峰,因此认为此峰可能与肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物

耐药关系密切。有研究报道^[3],通过肉眼观察特异峰 4 521 m/z 存在与否对 ST11 型产 bla_{KPC} 肺炎克雷伯菌进行鉴别的特异度为 95.20%,灵敏度为 96.90%。由于可能存在校准差异与峰形位移等,可以将 4 521 m/z 与本实验中得到 4 518 m/z 视为同一个峰。但由于本实验没有针对 bla_{KPC} 基因型进行进一步分型,因此 4 518 m/z 特异峰的灵敏度只达到 75%。即便如此,此峰在临床快速鉴定产碳青霉烯酶型肺炎克雷伯菌仍有巨大应用潜力。

对比 bla_{CTX-M-9} 基因型与无 bla_{KPC} 基因型的肺炎克雷伯菌,其中 4 518 m/z 的灵敏度为 80.00%(8/10),特异度为 85.70%(6/7),其灵敏度与特异度相较其他特异峰均较好,但通过耐药基因检测结果发现,具有 bla_{CTX-M-9} 基因型及具有 bla_{KPC} 基因型的菌株高度重合,因此认为 4 518 m/z 应与 bla_{KPC} 基因关联更密切而与 bla_{CTX-M-9} 基因型关系不大。同时,6 152 m/z 特异峰的灵敏度为 70%(7/10),特异度为 71.43%(5/7),其可能与 bla_{CTX-M-9} 基因型存在一定关联。但唯一 1 株只具有 bla_{CTX-M-9} 但不具有 bla_{KPC} 基因的 121 号肺炎克雷伯菌不具有 6 152 m/z 特异峰,因此其与 bla_{CTX-M-9} 基因的关联无法确定。因此需增加样本量对其进行检测,才能进一步探讨两者间的关系。同时,将具有 bla_{TEM} 基因型与无 bla_{TEM} 基因型的菌株进行对比,7 430 m/z 的特异峰虽然灵敏度高达 90.91%,但特异度只有 50.00%,因此认为其可能与肺炎克雷伯菌存在耐药本身有关。

从基因测序结果来看,只有 135 号肺炎克雷伯菌的基因中不存在 bla_{SHV} 和 ompK35,其余全部菌株中均存在这两个基因型,导致这两种基因型的阴性株过少。因此,即使在此基因型的对比分析中存在灵敏度高达 81.25%的 728 m/z 的峰,也不能排除是否是由于个体差异或者是随机误差导致的。且即使特异峰的结果具有一定意义,也无法确定其与 bla_{SHV} 或 ompK35 基因型其中哪一种基因型有关,或是两种基因型共同作用的结果^[10-11]。因此此特异峰在本实验中不具有临床意义。在今后的研究中仍需对这两个基因型进行进一步研究。

有报道称,日本学者发现产 bla_{KPC} 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌的特异峰 11 109 m/z,该特异峰的本质为 PKPQIL-p019 蛋白,编码该蛋白的基因与 bla_{KPC} 毗邻位于 PKPQIL 型质粒的 Tn4401 转座子内^[12]。然而该质粒仅仅在日本流行,在其他地区流行的不携带该质粒的产碳青霉烯酶型肺炎克雷伯菌无法检测到该特异峰^[13]。在本实验中获得的鉴定图谱中亦未发现 11 109 m/z 的特异峰。据此推测,对于遗传背景不同、同源性相差较大的菌株,其特异峰应也不尽相同,且其他基因型,其他耐药机制的耐药菌应都有一定地区差异性。因此,在此次试验中检测的北京天坛医院的 28 株肺炎克雷伯菌,说明其可能在本地区流

行病学中具有一定临床意义。这也从侧面说明了 MALDI-TOF MS 检测在区域流行病学里对病原菌的研究中拥有良好的应用前景。

本实验一共纳入了首都医科大学附属北京天坛医院的耐药菌 17 株,敏感菌 11 株,对其中存在的多种基因型均分别进行了比对,但实验仍具有一定局限性:(1)样本总量过少,某一基因型的耐药菌及无某一基因型的耐药菌株过少,结果可能在一定程度上反映了相对应的耐药机制,但仍不可避免的具有一定不可控性。bla_{SHV} 和 ompK35 基因型由于阴性对照过少无法得出结论,其余基因型由于阳性标本数量过少而无法得出结论,因此在今后的研究中将进一步增加样本量。(2)临床难以得到单一基因型的耐药肺炎克雷伯菌。复合耐药基因之间可能存在相互干扰,转录产生的蛋白之间有可能会发生反应,从而产生新的特征峰,但由于缺乏单一耐药基因的菌株,从而难以确定特征峰到底是由于几种基因共同存在而产生的还是仅与其中某单一基因型有关。(3)MALDI-TOF MS 方法无法定量检测。某些基因型导致的耐药可能是高表达和低表达的关系,并不是“有或无”,但由于 MALDI-TOF MS 的工作原理,峰的高低只是相较于参比峰的比值,并不是该细菌内此物质的绝对值多少,所以此类耐药机制的基因型可能用此方法难以检测。

综上所述,通过本研究表明使用 MALDI-TOF MS 来快速鉴定肺炎克雷伯菌耐药方式是实际可行的,且找到了如 bla_{KPC} 与 bla_{CTX-M-9} 的质谱相关蛋白。通过检测耐药肺炎克雷伯菌存在的特异峰来快速辨别其耐药机制,具有快速、简便、经济且适用性强等优点,对指导临床用药和流行病学分析具有重要意义。

4 结 论

本研究显示,利用 MALDI-TOF MS 对具有不同耐药基因型的肺炎克雷伯菌进行耐药性的预测具有一定的可行性,尤其是对于产碳青霉烯酶及 ESBLs 相关基因,灵敏度与特异度均维持在较高的水准,值得进行深入研究。

参考文献

- [1] HU F P, GUO Y, ZHU D M, et al. Resistance trends among clinical isolates in China reported from CHINET surveillance of bacterial resistance, 2005-2014 [J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22(Suppl 1): S9-S14.
- [2] XIE J H, PETERS B M, LI B, et al. Clinical features and antimicrobial resistance profiles of important Enterobacteriaceae pathogens in Guangzhou representative of Southern China, 2001-2015 [J]. Microb Pathog, 2017, 107(1): 206-211.
- [3] 余佳佳, 刘婧娴, 李媛睿, 等. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱快速检测 ST11 型产 KPC-2 肺炎克雷伯菌 [J]. 检验医学, 2018, 33(6): 536-542.

- [4] DEMARCO M L, BURNHAM C A. Diafiltration MALDI-TOF mass spectrometry method for culture-independent detection and identification of pathogens directly from urine specimens[J]. *Am J Clin Pathol*, 2014, 141(2): 204-212.
- [5] 李东菊, 朱元祺, 梁冰. MALDI-TOF MS 用于肺炎克雷伯菌同源性分析的初步研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2016, 20(5): 528-532.
- [6] CEBALLOS-GARZÓN A, CORTES G, MORIO F, et al. Comparison between MALDI-TOF MS and MicroScan in the identification of emerging and multidrug resistant yeasts in a fourth-level hospital in Bogotá, Colombia[J]. *BMC Microbiol*, 2019, 19(1): 106.
- [7] MONTAÑA S, HERNANDEZ M, FERNANDEZ J S, et al. Molecular characterization of KPC-2-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates from a neurosurgical centre in Argentina[J]. *New Microbes New Infect*, 2018, 24(1): 32-34.
- [8] LIU B, YI H H, FANG J, et al. Antimicrobial resistance and risk factors for mortality of pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* among diabetics: a retrospective study conducted in Shanghai, China[J]. *Infect Drug Resist*, 2019, 12(1): 1089-1098.
- [9] WELKER M, VAN BELKUM A, GIRARD V, et al. An update on the routine application of MALDI-TOF MS in clinical microbiology[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2019, 16(8): 695-710.
- [10] RANJBAR R, FATAHIAN K A, CHEHELGERDI M. Molecular characterization, serotypes and phenotypic and genotypic evaluation of antibiotic resistance of the *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different types of hospital-acquired infections[J]. *Infect Drug Resist*, 2019, 12(1): 603-611.
- [11] GALANI I, SOULI M, NAFPLIOTI K, et al. In vitro activity of imipenem-relebactam against non-MBL carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Greek hospitals in 2015-2016[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2019, 38(6): 1143-1150.
- [12] YOUN J H, DRAKE S K, WEINGARTEN R A, et al. Clinical performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry method for detection of certain bla_{KPC}-containing plasmids[J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(1): 35-42.
- [13] CHEN L, CHAVDA K D, MELANO R G, et al. Comparative genomic analysis of KPC-encoding pKpQIL-like plasmids and their distribution in New Jersey and New York Hospitals [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(5): 2871-2877.

(收稿日期: 2019-03-18 修回日期: 2019-07-12)

(上接第 2948 页)

- [4] WU Y, CHEN M, CUI Y, et al. Viral encephalitis in quantitative EEG[J]. *J Integr Neurosci*, 2018, 17(3/4): 493-501.
- [5] SMD R, HUSSAIN T, ABF A, et al. Gold nanoparticles: A plausible tool to combat neurological bacterial infections in humans[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107(1): 7-18.
- [6] TIMO H, NINA H, SAARA-MARI M, et al. Young male patients are at elevated risk of developing serious central nervous system complications during acute Puumala hantavirus infection[J]. *BMC Infect Dis*, 2011, 11(1): 217.
- [7] WYLLIE D H. Relation between lymphopenia and bacteraemia in UK adults with medical emergencies[J]. *J Clin Pathol*, 2004, 57(9): 950.
- [8] KLEIN R S, GARBER C, HOWARD N. Infectious immunity in the central nervous system and brain function [J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(2): 132.
- [9] YAMANAKA A, MOI M L, TAKASAKI T, et al. Utility of Japanese encephalitis virus subgenomic replicon-based single-round infectious particles as antigens in neutralization tests for Zika virus and three other flaviviruses[J]. *J Virol Methods*, 2017, 243(1): 164-171.
- [10] 吴学朕, 刘露, 王春晖, 等. SAA CRP 及白细胞计数对小儿细菌感染性疾病早期诊断的价值[J]. *浙江临床医学*, 2015, 32(12): 2191-2192.
- [11] YOMBI J C, SCHWAB P E, THIENPONT E. Neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) distribution shows a better kinetic pattern than C-reactive protein distribution for the follow-up of early inflammation after total knee arthroplasty[J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2016, 24(10): 3287-3292.
- [12] 陈晓梅, 翁建宇, 邓程新, 等. CLAT 方案治疗难治性急性髓系白血病的疗效观察[J]. *中国实验血液学杂志*, 2016, 24(2): 399-404.
- [13] CUNHA B A. The clinical and laboratory diagnosis of acute meningitis and acute encephalitis[J]. *Expert Opin Med Diagn*, 2013, 7(4): 343-364.
- [14] FRANK A M, BUCHHOLZ C J. Surface-engineered lentiviral vectors for selective gene transfer into subtypes of lymphocytes[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, 12(1): 19-31.
- [15] YANG Y, QIN Z, DU D, et al. Safety and short-term efficacy of irreversible electroporation and allogenic natural killer cell immunotherapy combination in the treatment of patients with unresectable primary liver cancer[J]. *Cardio Intervent Radiol*, 2019, 42(1): 48-59.

(收稿日期: 2019-04-22 修回日期: 2019-08-02)