

• 论 著 •

基于国产质谱 Autof ms1000 快速检测耐 β -内酰胺类 抗菌药物肠杆菌的研究评价

李海军, 边沁, 何先伟, 张韩, 冯金芳
(广元市中心医院检验科, 四川广元 628000)

摘要:目的 建立一种基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)快速检测不同肠杆菌耐药性的方法, 对比 MALDI-TOF MS 检测结果与常规药敏检测结果, 评估 MALDI-TOF MS 在检测细菌耐药性方面的可行性。方法 收集 10 株肠杆菌科菌株进行预实验(8 株耐药, 2 株敏感质控), 用 β -内酰胺类抗菌药物(氨苄西林、亚胺培南、美罗培南、厄他培南、头孢噻肟、头孢他啶)孵育耐药细菌一定时间后, 耐药菌会引起抗菌药物的水解, 从而造成 +18 的质量偏移, 通过 MALDI-TOF MS 检测药物水解情况, 得到细菌耐药性与敏感性分类。同时用微量肉汤稀释法进行药敏实验, 对比两种方法的药敏结果。采用预实验中的最佳实验条件, 选择 120 株肠杆菌科菌株进行批量验证实验, 对两种结果进行分析统计。结果 抗菌药物与耐药菌孵育 4 h 内, 氨苄西林水解在相对分子质量为 350、372、394 处峰消失, 亚胺培南在相对分子质量为 300 处峰消失、美罗培南在相对分子质量为 384、406 处峰消失, 厄他培南在相对分子质量为 475、498、520 处峰消失, 头孢噻肟在相对分子质量为 456、478 处峰消失, 头孢他啶在相对分子质量为 468 处峰消失, 敏感菌株特征峰仍然存在, 由此可判断菌株的耐药性。批量验证结果与微量肉汤稀释法结果一致, 且可在 4 h 内得到药敏结果。结论 国产质谱 Autof ms1000 可用于快速检测 β -内酰胺类细菌耐药情况, 结果准确可靠, 与常规药敏实验方法符合率高, 并且缩短了检测时间, 可提前指导临床早期合理使用 β -内酰胺类抗菌药物。

关键词:基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; β -内酰胺类抗菌药物; 肠杆菌科细菌; 耐药性检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.17.013 **中图分类号:**R372

文章编号:1673-4130(2020)17-2104-08 **文献标识码:**A

Research and evaluation of rapid detection of β -lactam-resistant enterobacteria based on domestic mass spectrometry Autof ms1000

LI Haijun, BIAN Qin, HE Xianwei, ZHANG Han, FENG Jinfang

(Department of Clinical Laboratory, Guangyuan Central Hospital, Guangyuan, Sichuan 628000, China)

Abstract: **Objective** To establish a method based on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid detection of drug resistance of different enterobacteria, to compare the results of MALDI-TOF MS with the results of conventional susceptibility testing to evaluate the feasibility of MALDI-TOF MS in detecting bacterial resistance. **Methods** A total of 10 strains of Enterobacteriaceae were collected for pre-experiment (8 resistant strains, 2 sensitive quality control strains). After incubating resistant bacteria with β -lactam antibacterial drugs (ampicillin, imipenem, meropenem, ertapenem, cefotaxime, ceftazidime) for a certain period of time. Drug-resistant bacteria could cause the hydrolysis of antibacterial drugs, resulting in a mass shift of +18. The drug hydrolysis was detected by MALDI-TOF MS to obtain the classification of bacterial resistance and sensitivity. At the same time, the susceptibility test was carried out with the micro broth dilution method to compare the susceptibility results of the two methods. Using the best experimental conditions in the preliminary experiment, 120 strains of Enterobacteriaceae were selected for batch verification experiments, and the two results were analyzed and counted. **Results** Within 4 hours of incubation between antimicrobial drugs and drug-resistant bacteria, ampicillin was hydrolyzed, and the peaks at relative molecular masses of 350, 372, and 394 disappeared, and the peaks at relative molecular masses of 300 disappeared for imipenem. The peaks at relative molecular masses of 384 and 406, meropenem disappeared. The peaks at relative molecular masses of 475, 498, and 520, ertapenem disappeared. The peaks at the relative molecular masses of 456 and 478, cefotaxime disappeared. The peak of ceftazidime at the relative molecular

作者简介:李海军,男,副主任技师,主要从事微生物鉴定方面的研究。

本文引用格式:李海军,边沁,何先伟,等.基于国产质谱 Autof ms1000 快速检测耐 β -内酰胺类抗菌药物肠杆菌的研究评价[J].国际检验医学杂志,2020,41(17):2104-2111.

weight of 468 disappeared, and the characteristic peak of sensitive strains still existed, so the drug resistance of the strain could be judged. The batch verification results were consistent with the results of the micro broth dilution method, and the drug sensitivity results could be obtained within 4 hours. **Conclusion** The domestic mass spectrometer Autof ms1000 can be used to quickly detect the drug resistance of β -lactam bacteria. The results of the method are accurate and reliable. It has a high coincidence rate with conventional drug susceptibility methods and shortens the detection time. It can guide the rational use of β -lactam antibacterial drugs in the early clinical stage.

Key words: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; β -lactam antibiotics; enterobacteriaceae bacteria; drug resistance detection

目前,由于抗菌药物滥用导致的细菌耐药性已经成为医学界面临的严重问题,越来越多的多重耐药甚至泛耐药菌株的出现,给人类的健康带来了极大威胁。据统计,由耐药菌引起的死亡人数已经达到了获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、乳腺癌和前列腺癌致死人数的总和^[1-2]。 β -内酰胺类抗菌药物是临床上使用较为广泛的抗菌药物,快速、经济、有效地检测 β -内酰胺类抗菌药物耐药性是能否将该抗菌药物用于治疗的先决条件^[3-4]。

常用的检测细菌耐药性的方法有手工法(纸片扩散法、微量肉汤稀释法和 E 试验法)和仪器法(全自动药敏分析仪)。其中,纸片扩散法操作简单,但受外界影响因素较大;微量肉汤稀释法比较经典,但是操作繁琐,人为干扰因素难以控制;E 试验法可准确测出最小抑菌浓度(MIC)数值,但使用成本较高,抗菌药物种类较少;全自动药敏分析仪使用方便,但耗时较长,且抗菌药物组合固定,部分抗菌药物临床实用性较差,价格昂贵^[5-6]。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)是一种检测微生物的新型技术,具有快速、准确、高通量等优点,目前,除了用于微生物鉴定,在细菌耐药性检测方面也有了新的进展^[7]。本研究同时采用 MALDI-TOF MS 法和微量肉汤稀释法对本院收集的 8 株肠杆菌科耐药菌进行检测,分析了两种方法的结果一致性,以期临床 β -内酰胺类抗菌药物的耐药检测提供方法参考并指导临床进行合理用药。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 预实验:收集本院临床科室送检标本中分离出的肠杆菌科耐药菌 8 株(为产 β -内酰胺酶的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌),肺炎克雷伯 ATCC 700603 及大肠埃希菌 ATCC 25922 由郑州安图生物工程股份有限公司提供。产 β -内酰胺酶抗性菌株是指一类能够对 β -内酰胺类抗菌药物(包括青霉素及其衍生物、头孢菌素、单酰胺环类和碳青霉烯类等)产生耐药性的革兰阴性菌,耐药机制主要为合成产 β -内酰胺酶从而有效降解抗生素抗菌活性。

批量验证实验:收集本院临床科室送检标本中分离出的产 β -内酰胺酶肠杆菌科耐药菌 104 株,敏感菌 16 株。

1.2 试剂 氨苄西林(美伦生物,10 mg/mL)、亚胺培南(美伦生物,0.5 mg/mL)、美罗培南(美伦生物,0.5 mg/mL)、厄他培南(美伦生物,0.5 mg/mL)、头孢噻肟(美伦生物,0.5 mg/mL)、头孢他啶(美伦生物,0.25 mg/mL)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)(美国 Sigma 公司),90 mm 血琼脂培养基(郑州安图生物),MH 肉汤培养基(英国 Oxoid 公司)。

1.3 仪器 全自动微生物质谱检测系统(Autof ms1000,郑州安图生物),比浊仪(法国梅里埃公司),离心机(美国 Sigma 公司),隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 菌株活化 将上述菌株接种于血琼脂平板上,37℃过夜培养。

1.4.2 微量肉汤稀释法 按照美国临床实验室标准化协会(CLSI)推荐的药敏标准方法对上述菌株进行药物敏感性实验。

1.4.3 MALDI-TOF MS 检测 选取 10 株上述菌株为检测对象,选择肺炎克雷伯 ATCC 700603 和大肠埃希菌 ATCC 25922 为阴性对照。分别按照氨苄西林(10 mg/mL)、亚胺培南(0.5 mg/mL)、美罗培南(0.5 mg/mL)、厄他培南(0.5 mg/mL)、头孢噻肟(0.5 mg/mL)、头孢他啶(0.25 mg/mL)配制抗菌药物溶液,吸取不同抗菌药物溶液 500 μ L 于 EP 管中,再用无菌枪头挑取过夜培养的单菌落,配成麦氏浓度为 4 的菌悬液,35℃孵育 0.5~4 h(氨苄西林及头孢类孵育 4 h,碳青霉烯类孵育 30~60 min),每管取出 100 μ L 孵育后的菌悬液,13 000 r/min 离心 2 min,取上清 1.5 μ L 点样,干燥后覆盖 1 μ L 基质,晾干后用 Autof ms1000 进行检测。空白对照为相同水平的抗菌药物溶液。最后用 Autof Analyzer 软件进行图谱分析。参数设置:线性正离子模式。离子源电压 1:20 kv;离子源电压 2:18.1 kv;聚焦极电压:7 kv;检测相对分子质量:0~1 000。

1.4.4 MALDI-TOF MS 结果判读 对于 β -内酰胺类抗菌药物, β -内酰胺酶水解 β -内酰胺环后将导致原始质量峰增加 18 的相对分子质量,在水解之后直接进行水解产物的脱羧,导致又发生了一 44 的质量偏移,这些相对分子质量的变化,可以通过 MALDI-

TOF MS 进行检测。常见的 β -内酰胺类抗菌药物及其降解产物的相对分子质量见表 1^[8-9]。

表 1 β -内酰胺类抗菌药物及其降解产物分子式和相对分子质量

抗菌药物	分子式	相对分子质量	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[M+2Na]^+$	$[M_{hydr}+H]^+$	$[M_{hydr}+Na]^+$	$[M_{hydr}+2Na]^+$	$[M_{hydr/decarb}+H]^+$
氨苄西林	$C_{16}H_{19}N_3O_4S$	394	350	372	349	368	390	412	324
亚胺培南	$C_{12}H_{17}N_3O_4S$	299	300	322	344	318	340	362	274
美罗培南	$C_{17}H_{25}N_3O_5S$	383	384	406	428	402	424	446	358
厄他培南	$C_{22}H_{25}N_3O_7S$	475	476	498	520	494	516	538	450
头孢噻肟	$C_{16}H_{17}N_5O_7S_2$	455	456	478	500	474	496	518	430
头孢他啶	$C_{22}H_{22}N_6O_7S_2$	547	548	570	592	566	588	610	522

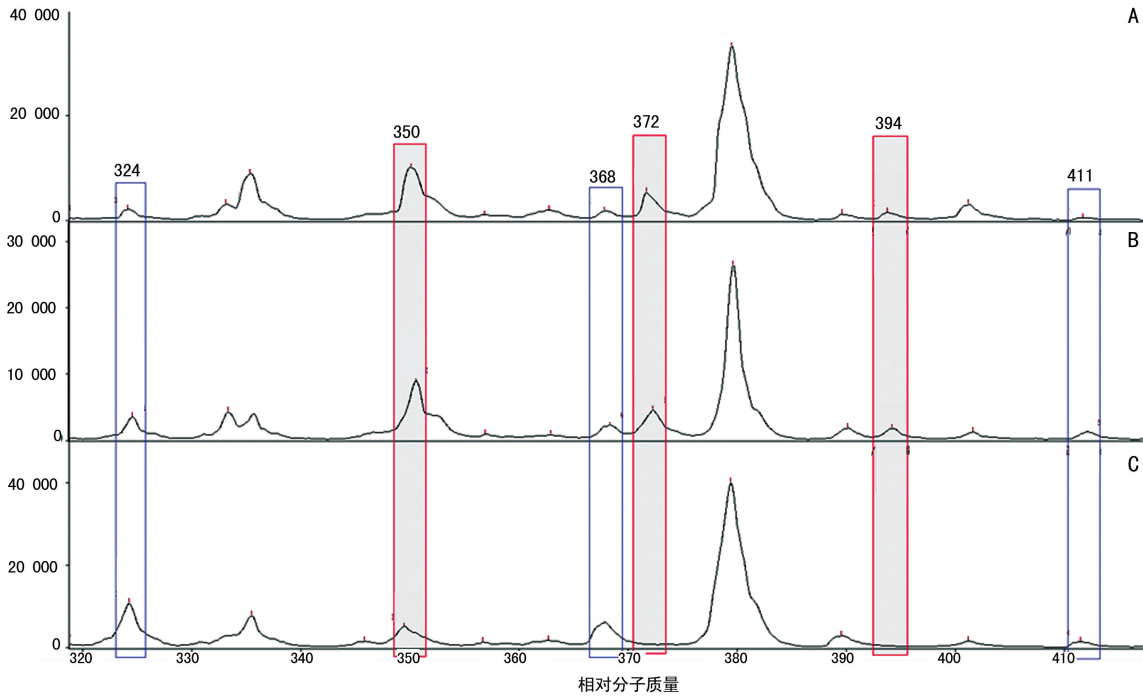
注： M_{hydr} 为水解产物； M_{decarb} 为脱羧产物； $M_{hydr/decarb}$ 为水解脱羧产物。

2 结 果

2.1 MALDI-TOF MS 检测结果

2.1.1 氨苄西林孵育后检测结果 用氨苄西林孵育上述菌株,35 ℃孵育 4 h 后,对图谱进行分析,8 株耐药菌均可以引起药物的水解反应。从图 1 中可以明显看出纯药物峰 350 的 $[M+H]^+$ 和相应的加钠峰 372 的 $[M+Na]^+$ 、394 的 $[M+2Na]^+$ 。在用对照菌株肺炎克雷伯 ATCC 700603 和大肠埃希菌 ATCC

25922 孵育后,质谱峰没有明显变化;相反,在用产 β -内酰胺酶的菌孵育之后,图谱显示氨苄西林的分子峰和相应的加合物的峰明显降低或消失,368 的 $[M_{hydr}+H]^+$ 、390 的 $[M_{hydr}+Na]^+$ 、412 的 $[M_{hydr}+2Na]^+$ 、324 的 $[M_{hydr/decarb}+H]^+$ 对应的水解脱羧峰强度明显升高,而在敏感菌株中,只是发生了轻微的水解。见图 1。



注:A 为空白对照;B 为阴性对照;C 为产 β -内酰胺酶耐药菌株。

图 1 氨苄西林孵育后质谱图

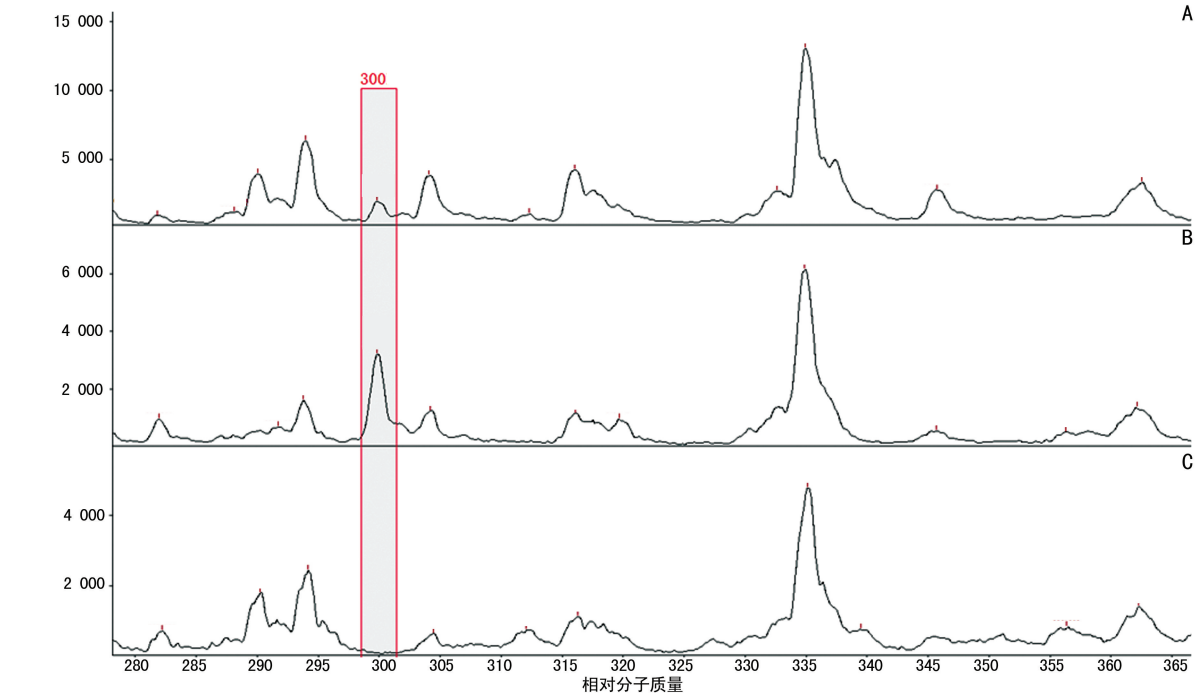
2.1.2 亚胺培南孵育后检测结果 用亚胺培南溶液孵育上述菌株,35 ℃孵育 30 min,从质谱峰中仅可观察到 300 的 $[M+H]^+$ 峰,没有观察到其他加合物的峰,在用耐药菌孵育后,300 的 $[M+H]^+$ 峰消失,其余对应的水解脱羧峰也没有出现,但所有的阳性标本均可以使 300 的 $[M+H]^+$ 峰消失,见图 2。因此,此峰可以作为评判标准,应用该标准,基于 MALDI-TOF MS 的结果与标准的常规方法的结果相匹配,见表 2。

2.1.3 美罗培南孵育后检测结果 用美罗培南溶液孵育上述菌株后,检测到分子峰 $[M+H]^+$ 在 384.5,钠加合物 $[M+Na]^+$ 在 406.5,没有检测到 406 的 $[M+2Na]^+$ 峰,美罗培南与耐碳青霉烯酶的菌株孵育后,对应的美罗培南分子峰消失,其水解产物仅检测到 358 的 $[M_{hydr/decarb}+H]^+$ 水解脱羧峰,以及 446 的 $[M_{hydr}+2Na]^+$ 峰,见图 3。但暂无法从图谱上分析此峰变化所对应的耐药情况。对于美罗培南,分子峰在

$[M+H]^+$ 384.5 和 $[M+Na]^+$ 406.5 的消失与碳青霉烯抗性菌株的存在相关,应用该标准, MALDI-TOF MS 的评估结果与常规的标准测定的结果相匹配,见表 2。

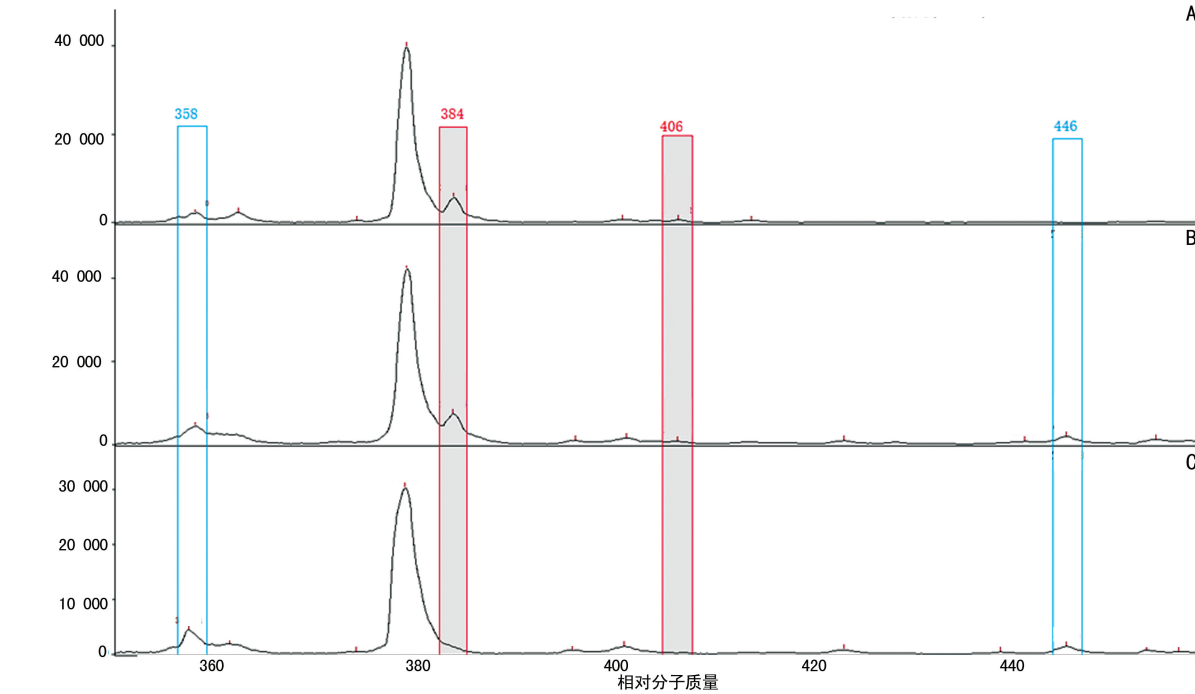
2.1.4 厄他培南孵育后检测结果 用 MALDI-TOF MS 检测到了 476、498、520 的峰,分别对应的是 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 、 $[M+2Na]^+$ 峰,在用厄他培南溶液

孵育菌株后,这些对应的分子峰在耐药菌株中消失,敏感菌株中仍存在;而对应的不同水解产物的峰分别出现在 494 的 $[M_{hydr}+H]^+$ 、538 的 $[M_{hydr}+2Na]^+$ 、450 的 $[M_{hydr/decarb}+H]^+$ 、472 的 $[M_{hydr/decarb}+Na]^+$,见图 4。通过以上峰的变化来判断菌株的耐药情况,结果与常规方法得出的结果一致,见表 2。



注:A 为空白对照;B 为阴性对照;C 为产 β -内酰胺酶耐药菌株。

图 2 亚胺培南孵育后质谱图



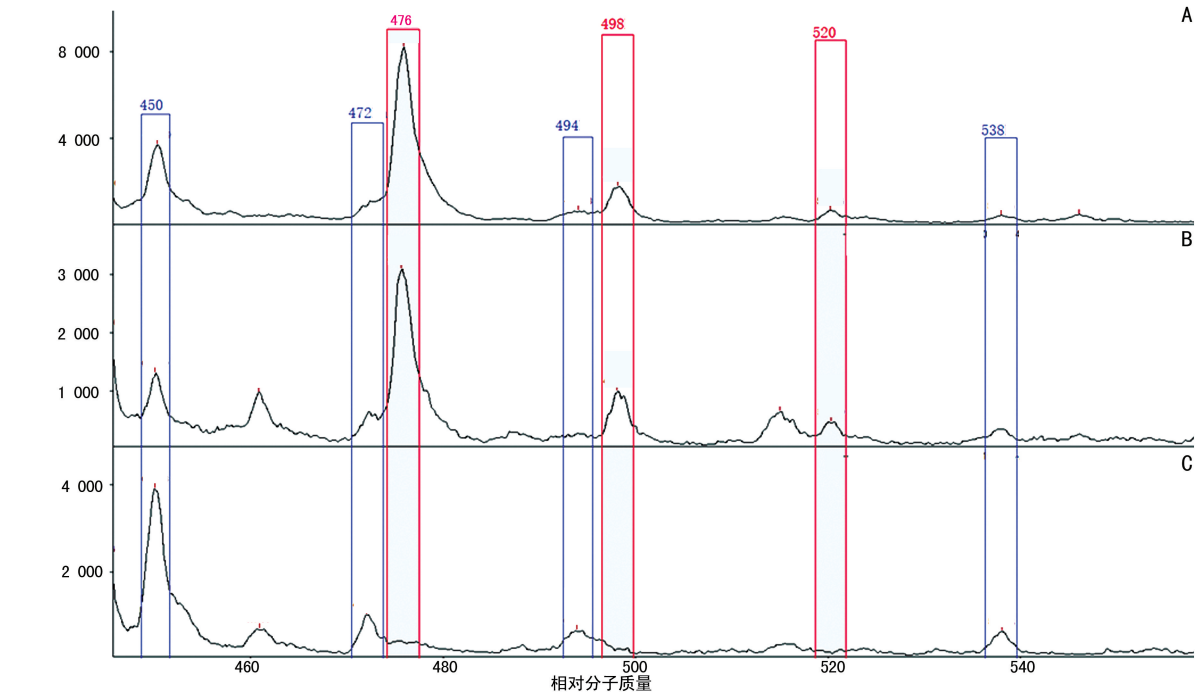
注:A 为空白对照;B 为阴性对照;C 为产 β -内酰胺酶耐药菌株。

图 3 美罗培南孵育后质谱图

2.1.5 头孢噻肟孵育后检测结果 用头孢噻肟溶液 孵育上述菌株后,在敏感菌株的图谱中可检测到头孢

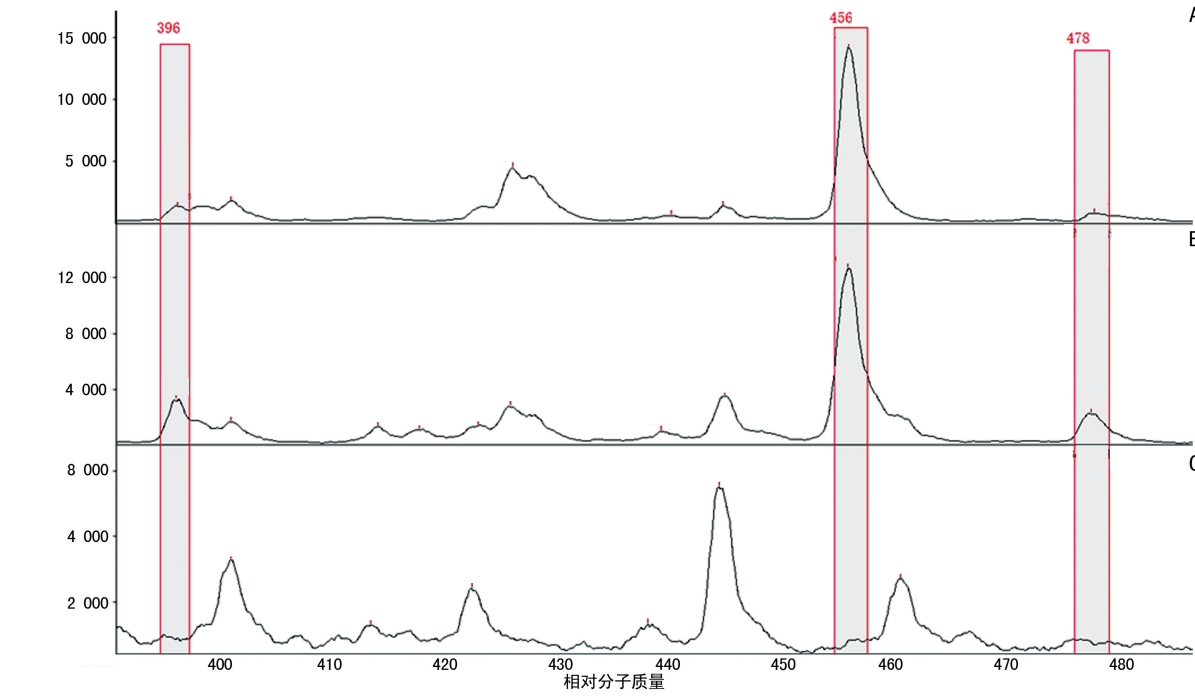
噻肟 456 的分子峰 $[M+H]^+$ 以及 478 的 $[M+Na]^+$ 峰,见图 5,头孢噻肟与阳性菌株的孵育导致分子峰在 456.1 与 478 处消失,没有观察到相应于+18(474)的头孢噻肟的水解产物,但是在-60 的位置,即 396 处观察到峰,考虑是对应的头孢噻肟乙酰基团的消除,

同样,在与耐药菌株孵育后,此峰明显消失,可通过 396、456、478 的峰来作为指示,判定菌株的耐药性。最后,通过 MALDI-TOF MS 获得的结果与常规方法获得的结果一致,见表 2。



注:A 为空白对照;B 为阴性对照;C 为产 β -内酰胺酶耐药菌株。

图 4 厄他培南孵育后质谱图



注:A 为空白对照;B 为阴性对照;C 为产 β -内酰胺酶耐药菌株。

图 5 头孢噻肟孵育后质谱图

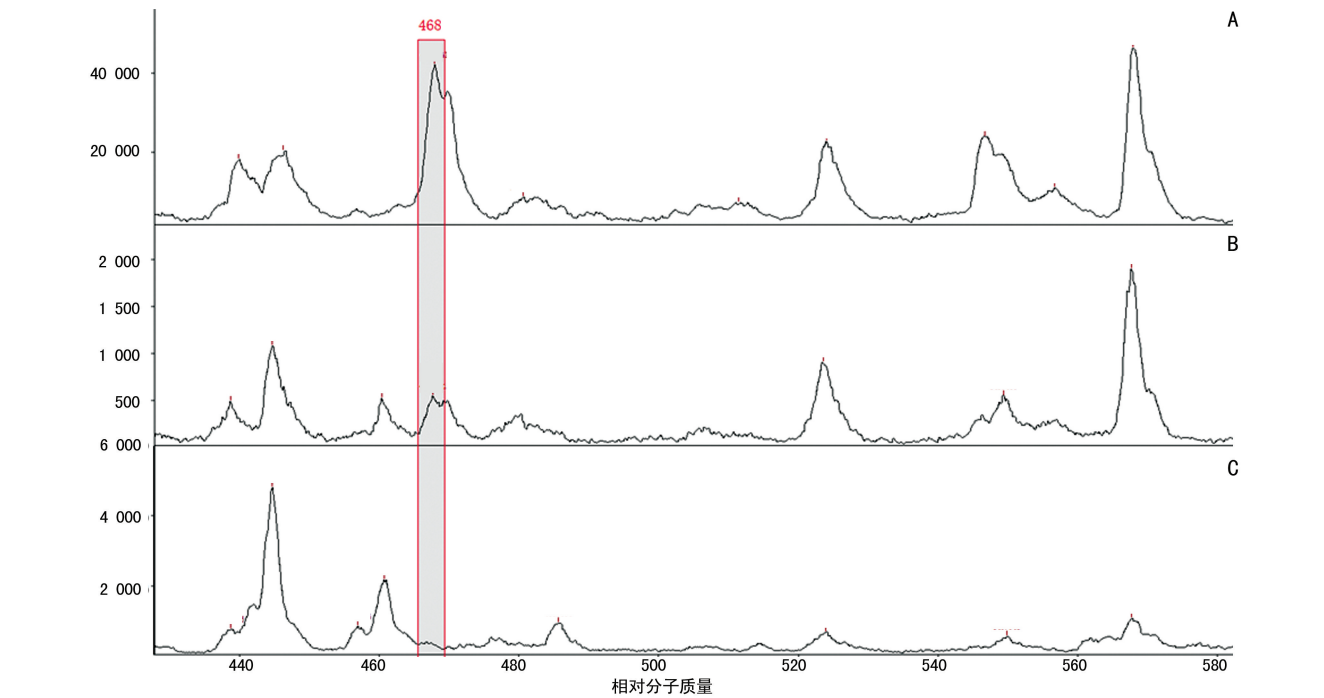
2.1.6 头孢他啶孵育后检测结果 用头孢他啶孵育耐药菌株后,检测不到其对应分子峰的变化,而在-79 的较低质量范围内,可见 468 的峰,考虑可能为

对应头孢他啶的吡啶环的消除,见图 6,耐药菌孵育后在 468 处可检测到吡啶消除的分子峰的水解,用 MALDI-TOF MS 测量获得的结果与用的常规方法

获得的结果进行比较,结果是完全匹配的,见表 2。

2.2 微量肉汤稀释法实验结果及对比 微量肉汤稀释法实验结果以及两种方法的结果对比如表 2 所示,微量肉汤稀释法与 MALDI-TOF MS 法得到的结果基本一致。

2.3 MALDI-TOF MS 批量验证 对获得的 104 株确定产 β -内酰胺酶的肠杆菌科菌株及 16 株敏感菌株进行批量验证实验,按照上述预实验中的实验条件进行孵育,并对结果进行统计。对比结果见表 3。



注:A 为空白对照;B 为阴性对照;C 为产 β -内酰胺酶耐药菌株。

图 6 头孢他啶孵育后质谱图

表 2 微量肉汤稀释法与 MALDI-TOF MS 法结果对比

菌株	方法	氨苄西林	亚胺培南	美罗培南	厄他培南	头孢噻肟	头孢他啶
阴性对照 ATCC 700603	MALDI-TOF MS	S	S	S	S	S	S
阴性对照 ATCC 25922	MALDI-TOF MS	S	S	S	S	S	S
1905058001	微量肉汤稀释法	R $\geq$ 32	R $\geq$ 16	R $\geq$ 16	R $\geq$ 2	R $\geq$ 64	R $\geq$ 64
	MALDI-TOF MS	R	R	R	R	R	R
1905041019	微量肉汤稀释法	R $\geq$ 32	R $\geq$ 16	R $\geq$ 16	R $\geq$ 2	R $\geq$ 64	R $\geq$ 64
	MALDI-TOF MS	R	R	R	R	R	R
190507G013	微量肉汤稀释法	R $\geq$ 32	R $\geq$ 16	R $\geq$ 16	R $\geq$ 2	R $\geq$ 64	R $\geq$ 64
	MALDI-TOF MS	R	R	R	R	R	R
1905066001	微量肉汤稀释法	R $\geq$ 32	R $\geq$ 16	R $\geq$ 16	R $\geq$ 2	R $\geq$ 64	R $\geq$ 64
	MALDI-TOF MS	R	R	R	R	R	R
190506G012	微量肉汤稀释法	R $\geq$ 32	R $\geq$ 16	R $\geq$ 16	R $\geq$ 2	R $\geq$ 64	R $\geq$ 64
	MALDI-TOF MS	R	R	R	R	R	R
1905054019	微量肉汤稀释法	R $\geq$ 32	R $\geq$ 16	R $\geq$ 16	R $\geq$ 2	R $\geq$ 64	R $\geq$ 64
	MALDI-TOF MS	R	R	R	R	R	R
1905051040	微量肉汤稀释法	R $\geq$ 32	R $\geq$ 16	R $\geq$ 16	R $\geq$ 2	R $\geq$ 64	R $\geq$ 64
	MALDI-TOF MS	R	R	R	R	R	R
1905046088	微量肉汤稀释法	R $\geq$ 32	R $\geq$ 16	R $\geq$ 16	R $\geq$ 2	R $\geq$ 64	R $\geq$ 64
	MALDI-TOF MS	R	R	R	R	R	R

注:S 表示敏感;R 表示耐药;R $\geq$ 32 即细菌耐药,最小抑菌浓度(MIC) $\geq$ 32。

表 3 120 株肠杆菌科菌株耐药结果

肠杆菌科	n	菌株	n	微量肉汤稀释法/MIC						MALDI-TOF MS
				氨苄西林	亚胺培南	美罗培南	厄他培南	头孢噻肟	头孢他啶	
产 β-内酰胺酶的耐药菌株	104	大肠埃希菌	47	R≥32	R≥16	R≥16	R≥2	R≥64	R≥64	+
		肺炎克雷伯菌	32	R≥32	R≥16	R≥16	R≥2	R≥64	R≥64	+
		产酸克雷伯	7	R≥32	R≥16	R≥16	R≥2	R≥64	R≥64	+
		产气肠杆菌	2	R≥32	R≥16	R≥16	R≥2	R≥64	R≥64	+
		产酸克雷伯	5	R≥32	R≥16	R≥16	R≥2	R≥64	R≥64	+
		阴沟肠杆菌	11	R≥32	R≥16	R≥16	R≥2	R≥64	R≥64	+
敏感菌	16	大肠埃希菌	4	R≥32	S≤1	S≤1	S≤0.5	S≤1	S≤4	—
		肺炎克雷伯	4	R≥32	S≤1	S≤1	S≤0.5	S≤1	S≤4	—
		产酸克雷伯	4	R≥32	S≤1	S≤1	S≤0.5	S≤1	S≤4	—
		阴沟肠杆菌	4	R≥32	S≤1	S≤1	S≤0.5	S≤1	S≤4	—

注:S 表示敏感,S≤1 即细菌对药物敏感,MCI≤1;R 表示耐药,R≥32 即细菌耐药,MIC≥32;+代表阳性,—代表阴性。

3 讨 论

MALDI-TOF MS 正逐渐引入临床实验室并应用于常规鉴定诊断,鉴定结果快速、准确,并可实现高通量。目前,MALDI-TOF MS 的其他应用方向也在不断开发中,很多研究报道了将 MALDI-TOF MS 应用于细菌耐药性检测^[11-13]。OVIANO 等^[11]利用 MALDI-TOF MS 对头孢类抗菌药物的 β-内酰胺活性进行检测,通过头孢噻肟及头孢他啶分子峰及水解产物峰的分布情况来判断 β-内酰胺酶活性,加入克拉维酸后,AmpC β 内酰胺酶(AmpC 酶)仍能水解头孢噻肟及头孢他啶,超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)水解被抑制。OVIANO 等^[12]还对 161 株 OXA-48[苯唑西林酶 OXA-48,D 类碳青霉烯酶,对青霉素类水解能力很强,从而对治疗严重细菌感染的抗菌药物(亚胺培南、美洛培南、帕尼培南、厄他培南、比阿培南)产生耐药性]菌株进行了替莫西林水解实验,由于替莫西林的降解产物不稳定,因此最终耐药性是根据替莫西林药物峰的完全消失或者同时降解产物峰的出现来判断的。MONTEFERRANTE 等^[13]利用 MALDI-TOF MS 检测细菌耐药性,并对该方法的孵育时间进行了优化,抗菌药物溶液水平降低可减少孵育时间,并且对实验结果没有影响,使用 1 mg/mL 厄他培南溶液时,需要孵育 100 min,但使用 0.1 mg/mL 厄他培南溶液时只需孵育 30 min,大大缩短了检测时间。

本研究结果表明,MALDI-TOF MS 法适用于分析不同类别的 β-内酰胺类抗菌药物。β-内酰胺类抗菌药物的中心 β-内酰胺环的水解导致相对分子质量出现+18 的变化,在水解之后直接进行水解产物的脱羧,导致相对分子质量又发生了一44 的变化,变化较大,因此可以通过质谱法检测出来。对于青霉素类抗菌药物氨苄西林,分子峰、单钠加合物和双钠加合物及其水解形式都可被检测出来。碳青霉烯类抗菌药物中,厄他培南也能检测出与氨苄西林类似的几个质

量峰,在水解脱羧后又形成了其加钠的 472 的峰,亚胺培南没有形成任何形式的加合物,导致在与碳青霉烯敏感细菌孵育后仅检测到 300 的分子峰,与耐药细菌孵育后,这个峰随即消失,可能是由于亚胺培南的水解产物不稳定,所以很难被检测到,与亚胺培南相比,美罗培南可以检测出单钠的加合物以及两个水解峰。在头孢类抗菌药物存在的情况下,头孢噻肟能检测到分子峰和单钠加合物的峰,以及-60 的峰,考虑这一结果的出现是头孢噻肟乙酰基团的消除导致的,而头孢他啶很难检测出来,因此仅在 468 位置检测到吡啶环消除后的峰^[14-15]。

通过以上相对分子质量峰的变化,可以准确地区分出敏感菌株和耐药菌株,实验所用的 120 株菌株耐药结果与微量肉汤稀释法得到的结果判定一致,符合率为 100%^[16-17],表明可将此方法用于 β-内酰胺类抗菌药物耐药性检测。使用微量肉汤稀释法需要过夜孵育培养,耗时过长,并且其中的工作量非常大,判定过程也易受人为因素干扰,而实验所用的国产质谱 Autof ms1000 操作简单,对人员要求较低,适用于 β-内酰胺类抗菌药物的耐药性检测。

4 结 论

MALDI-TOF MS 质谱仪具有鉴定速度快、准确和低成本等优势,目前已成为临床微生物检验领域最具潜力的技术之一,将 MALDI-TOF MS 进一步应用到耐药性检测上,可在较短时间内得到鉴定及药敏实验结果,尽早对临床进行用药指导,开启临床质谱新时代。

参考文献

[1] DEKRAKER M E, DAVEY P G, GRUNDMANN H, et al. Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe [J]. PLoS Med, 2011, 8(10): e1001104.

[2] 尹业师,陈华海,曹林艳,等. 细菌耐药性应对策略研究进展[J]. 生物工程学报,2018,34(8):1346-1360.

[3] HASHEMI A,FALLAH F,TAHERPOUR A,et al. Detection of metallo-beta-lactamases,extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), outer membrane porins among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients in Tehran[J]. J Zanzan University Med Sci,2015,23(98):89-102.

[4] 余佳佳,余静,刘瑛. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱检测 β -内酰胺酶的研究[J]. 上海交通大学学报(医学版),2017,37(4):566-570.

[5] 杨峰,陈飞,赵虎. MALDI-TOF MS 在细菌耐药性分析中的临床应用[J]. 检验医学,2017,32(1):57-63.

[6] 郑业焕,李轶,金湘东,等. 多黏菌素 B 药敏条在肠杆菌科药敏检测中应用研究[J]. 中国抗菌药物杂志,2019,44(11):1-4.

[7] 李秀娥,王双云,王禹. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱对常见细菌直接药物敏感性试验的可行性[J]. 技术方法,2017,20(6):154-155.

[8] SPARBIER K,SCHUBERT S,WELLER H,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.

[9] 李媛睿,俞静,刘瑛. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在革兰阴性杆菌对 β -内酰胺类抗菌药物耐药性检测中的应用进展[J]. 中国感染与化疗杂志,2016,16(2):229-234.

[10] LASSERRE C,MARTIN L D,CUZON G,et al. Efficient Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes[J]. J Clin Microbiol,2015,53(7):2163-2171.

[11] 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.

[12] OVIANO M,BARBA M J,FERNANDEZ B,et al. Rapid detection of OXA-48-producing enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol,2016,54(3):754-759.

[13] MONTEFERRANTE C G,SULTAN S,TENKATE M T,et al. Evaluation of different pretreatment protocols to detect accurately clinical carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by MALDI-TOF[J]. J Antimicrob Chemoth,2016,71(10):2856-2867.

[14] 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.

[17] LI B,GUO T,QU F,et al. Matrix-assisted laser desorption ionization: Time of flight mass spectrometry-identified models for detection of ESBL-producing bacterial strains[J]. Med Sci Monit Basic Res,2014,20:176-183.

[16] HRABAK J,STUDENTOVA V,WALKOVA R,et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 Carbapenemases by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry[J]. J Clin Microbiol,2012,50(7):2441-2443.

[17] 李媛睿,刘婧娴,俞静,等. 应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌对厄他培南的水解能力[J]. 中国感染与化疗杂志,2016,16(5):608-613.

(收稿日期:2020-02-02 修回日期:2020-04-15)

(上接第 2103 页)

JELBAKKEN T,et al. Red cell distribution width is associated with future risk of incident stroke [J]. Thromb Haemost,2016,115(1):126-134.

[13] PINHO J,MARQUES S A,FREITAS E,et al. Red cell distribution width as a predictor of 1-year survival in ischemic stroke patients treated with intravenous thrombolysis[J]. Thromb Res,2018,164:4-8.

[14] WEI Y Y,JIA L,XIANG L. Predicting the one-year prognosis and mortality of patients with acute ischemic stroke using red blood cell distribution width before intravenous thrombolysis[J]. Clin Inter Aging,2020,15:255-263.

[15] 李枝,丰宏林. 红细胞分布宽度与脑卒中关系的研究现状[J]. 神经疾病与精神卫生,2018,18(4):289-291.

[16] GANG H,HAI P L,QIU L L,et al. Red blood cell distribution width and ischaemic stroke[J]. Stroke Vasc Neurol,2017,2:e00007.

[17] 宋芷珩,范凌霄. 红细胞分布宽度和脑梗死患者颈动脉粥样硬化斑块稳定性的关系[J]. 中风与神经疾病杂志,2015,32(8):708-711.

(收稿日期:2020-01-28 修回日期:2020-04-25)