

• 综 述 •

MALDI-TOF MS 在常规标本病原菌鉴定和细菌 耐药性检测中的应用及进展^{*}

张雅静 综述, 李劭昱[△] 审校

新疆医科大学附属肿瘤医院检验科, 新疆乌鲁木齐 830011

摘 要:病原菌能够入侵宿主体内并产生致病物质造成宿主感染, 耐药菌的出现更是严重影响了患者的生活质量和临床微生物的检验、治疗进程。本文就基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)在常规标本病原菌鉴定和耐药菌检测中的应用及进展进行总结, 概述了 MALDI-TOF MS 对血培养阳性标本、尿路感染标本和呼吸道感染标本中病原菌的鉴定, 并将耐药菌的检测按是否借助抗菌药物分为直接检测和间接检测两方面, 检测耐药菌的特征峰、所产酶和细胞组分的方法为直接检测, 通过加入抗菌药物以检测耐药菌的方法为间接检测。MALDI-TOF MS 在病原菌鉴定和耐药菌检测方面有良好的效果, 凭借其操作简便、省时、精确、高通量、低成本等优势, 在未来同样具备很大的潜力。各实验室应建立符合自己实验室的 MALDI-TOF MS 检测体系, 规范标本前处理、基质选择等, 缩短检测周转时间, 为临床提供准确的检验报告, 指导感染患者的救治。

关键词:基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 细菌鉴定; 药敏分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.11.022

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2022)11-1383-07

文献标志码:A

Application and progress of MALDI-TOF MS in pathogenic bacterial identification and bacterial drug-resistant detection in routine samples^{*}

ZHANG Yajing, LI Shaoyu[△]

Department of Clinical Laboratory, Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical
University, Urumqi, Xinjiang 830011, China

Abstract: Pathogenic bacteria can invade the host body and produce the pathogenic substances to cause host infection, and the emergence of drug-resistant bacteria has seriously affected the quality of life of the patients and the process of clinical microbiological examination and treatment. The application and progress of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in identification of pathogenic bacteria and detection of drug-resistant bacteria in conventional specimens are reviewed in this paper. The identification of pathogenic bacteria in blood culture positive specimens, urinary tract infection specimens and respiratory tract infection specimens by MALDI-TOF MS is summarized, and the detection of drug-resistant bacteria is divided into the direct detection and indirect detection according to whether using the help of the antibacterial drugs. The method of detecting the characteristic peaks, produced enzymes and cell components of drug-resistant bacteria is the direct detection. The indirect detection is performed by adding antibacterial drugs to detect the resistant bacteria. MALDI-TOF MS has good effect in the aspects of the pathogenic bacterial detection and drug-resistant bacterial detection. With its advantages of simple operation, time-saving, precision, high throughput and low cost, it also has great potential in the future. Each laboratory should establish the MALDI-TOF MS detection system suitable for own laboratory, standardize the specimen pre-treatment, matrix selection, etc., shorten the test turnaround time to provide the accurate test reports to the clinic and guide the treatment of the patients.

Key words: matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry; bacterial identification; drug sensitivity analysis

^{*} 基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(2017D01C367)。

[△] 通信作者, E-mail: 120081395@qq.com。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20220419.1001.002.html\(2022-04-20\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20220419.1001.002.html(2022-04-20))

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)主要利用质谱图中的特征峰对细菌进行鉴定和分类。MALDI-TOF MS 由基质辅助激光解吸离子源和飞行时间质量探测器组成,即 MALDI+TOF。其原理为标本与基质混合点于金属靶板上并出现结晶析出现象,激光照射结晶后,基质获得能量发生汽化、降解并与标本吸附解离,基质和标本间进行电荷转移,标本分子获得质子成为离子,于电场之中,标本离子飞速运动、聚焦,最终进入飞行时间探测器,离子的质荷比和飞行时长的平方之比为常数,根据飞行时长能够探测到不同质荷比的离子,用最终获得的质谱图区分和鉴别不同微生物。目前,MALDI-TOF MS 在微生物检验领域已取得较好的应用效果。CLARK 等^[1]提出,MALDI-TOF MS 可以用于革兰阳性细菌(葡萄球菌、链球菌、肠球菌、乳球菌、芽孢杆菌、棒状杆菌、李斯特菌等)、革兰阴性细菌(肠杆菌等),以及厌氧菌、分枝杆菌等多种细菌的鉴定。BLOSSER 等^[2]发现,MALDI-TOF MS 可用于鉴定临床相关诺卡菌。SALI 等^[3]用 MALDI-TOF MS 检出了布鲁菌。LI 等^[4]也探讨了 MALDI-TOF MS 对于厌氧菌的快速检测。此外它也可以用于细菌分型、细菌毒力检测、微生物亚种水平鉴别以及耐药检测等。

1 MALDI-TOF MS 鉴定常规标本中的病原菌

MALDI-TOF MS 可对血培养、尿液、痰液等标本中的病原菌进行早期鉴定,便于临床及时救治细菌感染患者,使患者体内微生物恢复稳态。

1.1 血培养阳性标本的鉴定 ALTUN 等^[5]用 MALDI-TOF MS 鉴定固体培养基短期培养后的血流感染病原菌,发现仅需 2.5 h 培养时长鉴定准确率便可达到 58.3%,5.5 h 后鉴定准确率能达 82.3%,结果表明 MALDI-TOF MS 在鉴定血培养阳性方面较有优势,不需要很长的培养时间,从而节省了检测时间。KÖCK 等^[6]通过相同方法鉴定血培养阳性标本,与传统方法相比,所耗时长由 15 h 缩短到了 3 h。ZHOU 等^[7]开发了一种“内部”(IH)方案,用 MALDI-TOF MS 直接进行血培养阳性标本中病原菌的鉴定,对于单菌种培养,有 94.4%可以准确鉴定到种和属,其中厌氧菌的鉴定准确率达 80%;对于多菌种培养,若采用标准模式,能够准确鉴定出血培养多种阳性菌株中的单一菌种,若采用混合法,52.9%的标本可被准确检出两种病原菌。FLORIO 等^[8]利用 MALDI-TOF MS 提出了一种快速鉴定多菌种血培养中病原菌的方法,即将病原菌先在液体培养基中进行短期的选择培养,然后用质谱进行鉴定,总鉴定准确率可达 85.7%。在含有两种不同病原菌的血培养中,其鉴定准确率达 100%;在含有两种以上病原菌的血培养中,其鉴定出两种病原菌的准确率达 86%。相比于常规方法,链球菌及肠球菌的鉴定时长缩短到 4.2 h,葡萄球菌的鉴定时长缩短到 8.7 h,革兰阴性

菌的鉴定时长缩短到 11.1 h。WANG 等^[9]将标本前处理后用 MALDI-TOF MS 直接鉴定血培养阳性瓶,此过程可以控制在 1 h 内,并且总鉴定准确率达 94.5%,其中革兰阴性菌、革兰阳性菌的鉴定准确率分别为 96.9%、94.5%。可见 MALDI-TOF MS 大大解决了常规方法耗时长、工作效率低的问题,能够快速、准确地鉴定出血培养阳性标本中的病原菌。

1.2 尿路感染标本的鉴定 HAIKO 等^[10]用 U-si-MALDI-TOF(尿液短孵化 MALDI-TOF)方法鉴定尿液中的病原菌,革兰阴性菌的鉴定准确率可达 86%,其中大肠埃希菌的检测周转时间缩短到了 4~6 h,为尿路感染标本的检测做出了很大贡献。LI 等^[11]发现将流式细胞仪筛查、MALDI-TOF MS 及 VITEK 2 Compact 的鉴定和药敏分析相结合可以用于尿路感染的快速确诊,细菌的总检出率为 86.42%,革兰阴性菌的检出率为 88.59%,其中肠杆菌的鉴定准确率达 94.83%,并且整个过程仅需 7~9 h。ILKI 等^[12]同样将尿液经流式细胞仪进行菌量筛选后用 MALDI-TOF MS 进行病原菌鉴定,可检测出 91.8%的菌株,革兰阴性菌的总鉴定准确率为 95.8%,其中大肠埃希菌的鉴定准确率为 90.0%,肺炎克雷伯菌的鉴定准确率为 87.0%。SUN 等^[13]通过 UF-5000i 流式细胞仪筛选出尿路感染标本后用 MALDI-TOF MS 直接进行尿液病原菌的鉴定,鉴定准确率达 94.7%,并且能将时间控制在 1 h 内。因此,用 MALDI-TOF MS 鉴定尿路感染标本时,不仅能够缩短标本周转时间(TAT),而且能获得十分可靠的结果,其中对革兰阴性菌的鉴定尤为准确,使尿路感染患者及早得到救治。

1.3 呼吸道感染标本的鉴定 MEDIAVILLA-GRADOLPH 等^[14]用 MALDI-TOF Bruker 鉴定呼吸道感染标本来源的分枝杆菌,其中非结核分枝杆菌(NTM)的鉴定准确率达 98.4%。LÓPEZ-FABAL 等^[15]用 MALDI-TOF MS Vitek 检测呼吸道感染标本来源的分离株,检出了 100%的卡他莫拉菌、86%的肺炎链球菌、79%的流感嗜血杆菌,该方法不仅鉴定准确率优于常规方法,而且能够正确定义存在争议的鉴定结果。FERNÁNDEZ-ESGUEVA 等^[16]利用 MALDI-TOF MS(检测仪器是布鲁克·道尔顿公司的产品)直接鉴定 MGIT 液体培养基中的分枝杆菌,避免了琼脂平板培养的时间消耗,加快了检测进度,并且鉴定准确率达到 98.06%,证明了该质谱可以用于诊断分枝杆菌导致的呼吸道感染。可见 MALDI-TOF MS 在呼吸道感染标本的鉴定方面比传统的常规方法更加省时并且准确率更高,更利于临床工作的开展。

2 MALDI-TOF MS 检测细菌的耐药性

MALDI-TOF MS 对细菌耐药性的检测大致可以归纳为不借助抗菌药物的直接检测和借助抗菌药

物的间接检测。

2.1 直接检测

2.1.1 直接检测耐药菌的特征峰 耐药菌与敏感菌的质谱图存在着一定水平的差异,例如特征峰强度的改变(增高或降低)、峰的缺失或增加、峰值坐标空间位置的移动,据此创建的耐药菌菌谱库可以直接用于耐药菌的检测。

2.1.1.1 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的检测 胡燕燕等^[17]实验得出区分 MRSA 和甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)最主要的特征峰为 3 279、6 485、6 555、3 299 m/z 处的峰,MRSA 组 3 299 m/z 处的质谱峰高于 MSSA 组,而 3 279、6 485、6 555 m/z 处的质谱峰低于 MSSA 组。*mecA* 基因可以介导细菌对甲氧西林耐药,其位于葡萄球菌盒染色体 *SCCmec* 盒上,所以 MRSA 基因组中的 II、III、VIII 型 *SCCmec* 盒上可编码一种小肽(PSM-*mec*),该小肽可被 MALDI-TOF MS 检测到。RHOADS 等^[18]用 MALDI-TOF MS 筛选 MRSA 时发现了 2 415 m/z 处的特征峰并利用反义 RNA 技术确定了该峰为 PSM-*mec*,进而表明了 MRSA 的存在,虽然该峰并不是 MRSA 的特有峰,但从某种意义上说,这启发了一种新的检测思路。KIM 等^[19]基于 MALDI-TOF MS 并根据 *mecA* 和 *SCCmec* 分型,鉴定出了 21 个峰在 MRSA 和 MSSA 间有明显差异,并将特定的峰值进行组合,这些组合峰为 MRSA 的鉴定提供了更充分的依据。WANG 等^[20]在 2 415、2 455、2 545、3 035、3 895、5 005、5 525、6 425、6 435、6 595 m/z 左右的 MRSA 特征峰的基础上,又发现了一种现象,即在 2 435 m/z 附近 MRSA 的特征峰较 MSSA 多,在 5 285、6 905 m/z 附近 MSSA 的特征峰较 MRSA 多, MALDI-TOF MS 基于这些特征峰的检测使得 MRSA 和 MSSA 更加便于区分。MALDI-TOF MS 对于 MRSA 的检测,告别了常规方法的费时、费力,为未来临床上 MRSA 的检测提供了更多的便利。

2.1.1.2 耐万古霉素肠球菌(VRE)的检测 吴薇等^[21]基于 MALDI-TOF MS 发现了两个差异峰存在于 VRE 与万古霉素敏感肠球菌(VSE)之间,分别为 3 516.14、3 644.12 m/z,可以用于 VRE 的初筛。陆文香等^[22]用 MALDI-TOF MS(检测仪器为德国布鲁克公司的产品)检测出 2 194.94、3 022.15、3 167.47、4 058.08 m/z 的质谱峰是用于区分 VRE 和 VSE 的最主要特征峰,且灵敏度、特异度均高于 80%,使得对 VRE 和 VSE 的鉴别更加明确。同年, HUANG 等^[23]用 MALDI-TOF MS 检测 VRE,灵敏度及特异度均在 90%以上,与 ChromID VRE 产色琼脂培养基检测相比, TAT 缩短到了 29 h 并且检测成本较低。MALDI-TOF MS 对于耐药菌特征峰的检测,结果可靠、省时、节省成本,是一种检测 VRE 的好方法。

2.1.2 直接检测耐药菌所产酶 β -内酰胺酶包括超

广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)、广谱酶、碳青霉烯酶[A 类如 KPC 酶, B 类为金属 β -内酰胺酶(MBL, 简称金属酶), D 类如 OXA 酶]、头孢菌素酶(Amp C 酶)等,可以水解 β -内酰胺类抗菌药物从而造成菌株耐药。耐药脆弱拟杆菌的 DNA 包含 *cfiA* 基因,可编码一种 MBL。NAGY 等^[24]用 MALDI-TOF MS 得出 *cfiA* 阳性和 *cfiA* 阴性的脆弱拟杆菌在 4 000~5 500 m/z 的质谱峰存在着差异,即 *cfiA* 基因阴性菌株位于 4 711、4 817 m/z 处的峰,在 *cfiA* 基因阳性菌株中分别漂移到了 4 688、4 826 m/z 处,于是可以区分 *cfiA* 阳性菌株与 *cfiA* 阴性菌株,从而筛选出产 MBL 的菌株。ESPINOSA 等^[25]用 MALDI-TOF MS 发现 39 800 m/z 左右的峰仅出现在产 CMY-2 型 Amp C 酶的菌株中,并且灵敏度和特异度均为 100%,可以用于此类产酶菌的检测。CHANG 等^[26]用 MALDI-TOF MS 检测到了鲍曼不动杆菌的 ADC 型 Amp C 酶,对应 40 279 m/z 左右的质谱峰,灵敏度和特异度分别为 96%、73%。ROCCO 等^[27]用 MALDI-TOF MS 成功检出了肺炎克雷伯菌的 p019 蛋白即对应 11 109 m/z 处的质谱峰,该峰几乎存在于所有产 KPC 酶的菌株中,灵敏度、特异度分别为 95.7%、100.0%,可以作为产 KPC 酶菌株的相关峰,与常规方法相比, TAT 缩短到了 24 h。FIGUEROA-ESPINOSA 等^[28]用 MALDI-TOF MS 测得 28 544 m/z 的峰仅存在于产 KPC-2 酶的菌株中,灵敏度、特异度均为 100%,可将其作为产 KPC-2 酶菌株的特征峰。这些研究说明用 MALDI-TOF MS 检测细菌所产酶的灵敏度、特异度均很高,并且可以起到缩短 TAT 的作用,进而为产酶菌的鉴定提供了一种新方法。

2.1.3 直接检测耐药菌的细胞组分 (1)外膜蛋白。外膜蛋白可以调节抗菌药物进出细菌,其缺失或减少是耐药菌的耐药机制之一。OmpC、OmpF 是大肠埃希菌主要的外膜蛋白, HU 等^[29]报道,用 MALDI-TOF MS 检测大肠埃希菌时并未发现 37 000、38 000 m/z 处的质谱峰,即代表该菌株属于大肠埃希菌 EC1-EC3、EC6-EC8 菌株,因为这类菌株不能表达外膜蛋白 OmpC、OmpF。OmpK35、OmpK36 是肺炎克雷伯菌主要的膜孔蛋白, PINTO 等^[30]通过 MALDI-TOF MS 发现膜孔蛋白 OmpK36 对应于 38 700 m/z 的峰,此次,对膜孔蛋白 OmpK35 的检测并不足,但是 MALDI-TOF MS 凭借节省时间这一大优势,足以替代十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)应用于快速鉴定膜孔蛋白 OmpK36 缺少的肺炎克雷伯菌,为后期的抗菌治疗提供针对性的依据。该研究团队还发现外膜蛋白 OmpA 对应于 36 000 m/z 的峰, OmpA 也是大肠埃希菌具有的一种外膜蛋白。涂海健等^[31]用 MALDI-TOF MS 检测出了外膜蛋白 OmpK35,其对应于 37 200 m/z 的峰,而 SDS-PAGE 并不能将其检出,这更说明了 MALDI-TOF

MS 在检测细菌外膜蛋白方面更胜一筹。通过直接检测细菌的外膜蛋白,将 MALDI-TOF MS 用于耐药菌的筛选,使得耐药菌的检测路径更加多样化。(2)脂多糖。脂多糖是革兰阴性菌细胞外壁的重要组分,其结构之一为脂质 A。肠杆菌科细菌对多黏菌素的耐药性多与脂多糖的修饰有关,例如脂质 A 的磷酸乙醇胺(pETN)修饰和 4-氨基-L-阿拉伯糖(L-Ara4N)修饰。DORTET 等^[32]开发了一种基于 MALDI-TOF MS 的 MALDIxin 试验,即用于检测对多黏菌素耐药的革兰阴性菌,在这类菌中发现了脂质 A 的 pETN 修饰,即在天然脂质 A 质谱峰(1 796 m/z)的基础上增加了 123 m/z。该团队又对 MALDIxin 试验进行了优化,即增加了温和酸水解步骤,不仅发现了脂质 A 的 pETN 修饰,还快速鉴定出被 L-Ara4N 修饰的脂质 A,因此优化后的 MALDIxin 试验可以更好地用于多黏菌素耐药菌的检测^[33]。MALDI-TOF MS 可以通过直接检测脂多糖从而鉴定出因脂多糖的修饰而产生耐药的细菌,可见,这种质谱方法能够依据细菌的耐药机制针对性地对细菌进行检测。

2.2 间接检测

2.2.1 根据抗菌药物的改变 细菌产生的酶可以使抗菌药物发生诸多改变,如水解、脱羧、乙酰化等,而造成菌株耐药,MALDI-TOF MS 常常可以根据抗菌药物的改变将耐药菌检测出来。携带 KPC-2、NDM-1 和 VIM-1/2、IMP-1/2 酶的菌株可以将厄他培南完全降解。BURCKHARDT 等^[34]用 MALDI-TOF MS 发现当这类产酶菌存在时,476、498、521 m/z 的厄他培南峰及其钠加合物峰完全消失,在此基础上出现了 450 m/z 的水解产物峰。HRABAK 等^[35]将美罗培南与携带 KPC-2/3、OXA-48/162、VIM-1 和 NDM-1 酶的肠杆菌科细菌以及携带 NDM-1 酶的鲍曼不动杆菌共孵育,用 MALDI-TOF MS 检测发现 383、405、427 m/z 的美罗培南完整峰消失的同时出现了 358.5、380.5 m/z 的脱羧产物峰,用于产碳青霉烯酶菌株的鉴定。SPARBIER 等^[36]将氨苄西林与大肠埃希菌 DH5 α 共孵育时,用 microflex LT (检测仪器为德国布鲁克公司的产品)可以检测到 350.1、372.1、394.1 m/z 的氨苄西林峰及其钠加合物峰,但与产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌共孵育时,这 3 个峰均降低的同时出现了 367.9、389.9、411.8、324.0 m/z 的水解及脱羧产物峰。JOHANSSON 等^[37]将厄他培南与产 KPC 酶的肺炎克雷伯菌共孵育,与 BURCKHARDT 等^[34]用 MALDI-TOF MS 测得的峰值相近,并未发现 476、498、520、542 m/z 的厄他培南完整峰,但新增了 472、494、516、538 m/z 的水解产物峰。LASSERRE 等^[38]借助产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌(CPE)提出了一种基于 MALDI-TOF MS 计算 MS 比值的方法,即抗菌药物水解产物的峰值/(抗菌药物水解产物的峰值+抗菌药物的峰值),当 MS 比

值 ≥ 0.82 时,该菌判定为 CPE。CALDERARO 等^[39]将美罗培南与 CPE 共孵育,与 HRABAK 等^[35]用 MALDI-TOF MS 测得的结果相近,并未发现 384、406、428 m/z 处的美罗培南完整峰,但出现了 358、380、402、424 m/z 的水解产物峰及脱羧产物峰,凭借美罗培南质谱峰的改变能够快速检测出 CPE,同时,他们发现了不同酶降解抗菌药物的能力不同,产 KPC 酶的菌株在 30 min 后便可将美罗培南完全降解,而产 MBL 的菌株则需在 1 h 后才能将美罗培南完全降解。冯丽娜等^[40]将亚胺培南与 CPE 共孵育时,发现(300.00 $\pm$ 0.55)m/z 的亚胺培南峰完全消失,因此,MALDI-TOF MS 也可以借助亚胺培南将 CPE 检出。AAC(6')-I b 酶是一种重要的氨基糖苷乙酰基团转移酶,其突变体 AAC(6')-I b-cr 酶能够使氨基糖苷类抗菌药物和氟喹诺酮类抗菌药物失去活性。PARDO 等^[41]通过 MALDI-TOF MS 发现当肠杆菌科细菌产生 AAC(6')-I b-cr 酶时,乙酰化的改变会使抗菌药物的相对分子质量增加 42 000,可以用于此类产酶菌的鉴定。OVIAÑO 等^[42]用 MALDI-TOF MS 检测大肠埃希菌对诺氟沙星和环丙沙星的乙酰化改变时,也得到了相似的结果,+相对分子质量 43 000 峰可以用于鉴定产 AAC(6')-I b-cr 酶的肠杆菌科细菌,此过程在 1 h 内即可完成。MALDI-TOF MS 操作简便、高效,可以将其应用于不同产酶菌的检测中。

2.2.2 根据有无抗菌药物时细菌的质谱差异 抗菌药物会抑制敏感菌的生长,使其浓度大大降低,质谱峰强度变弱,而对耐药菌无抑制作用,因而耐药菌的质谱峰强度相对较强,根据有无抗菌药物时质谱峰的 ROC 曲线下面积(AUC)可以判断细菌是否耐药。JUSTESEN 等^[43]利用一种基于 MALDI-TOF MS 的细菌药敏测试方法,即 MALDI Biotyper 药敏试验快速测定法(MBT-ASTRA),将脆弱拟杆菌分别置于含及不含抗菌药物的培养基中进行培养,最终根据 AUC 计算相对生长率(RG),RG 值为含抗菌药物的 AUC 与不含抗菌药物的 AUC 的比值,以界定细菌耐药与否,RG < 0.4 判定为敏感菌株,RG > 0.4 则判定为耐药菌株。根据这个方法,研究者可以通过将不同抗菌药物与细菌相结合的方式鉴定细菌的药物敏感或耐药。

2.2.3 同位素标记联合抗菌药物共孵育 用同位素对培养基中的某种特定氨基酸进行标记,当加入抗菌药物时只有耐药菌可以利用经标记的氨基酸顺利生长并合成新的蛋白质,使得质谱峰的位置发生偏移或出现新的质谱峰,通过 MALDI-TOF MS 可以从诸多菌株中鉴别出耐药菌,目前这种联合法已用于对 MR-SA 的检测中。SPARBIER 等^[44]将试验菌株同时置于“正常”(正常赖氨酸)、“重”(13C₆15N₂ 标记的赖氨酸)以及“重+抗菌药物”(13C₆15N₂ 标记的赖氨酸+苯唑西林)培养基中进行培养,用 MALDI-TOF MS 检

测发现耐药菌的“重+抗菌药物”谱与“重”谱十分相似,而敏感菌的“重+抗菌药物”谱更接近“正常”谱,从而可以用于 MRSA 的鉴定。DEMIREV 等^[45]用大肠埃希菌来检验同位素标记的性能,将大肠埃希菌置于未标记和¹³C 标记的培养基中进行培养,并成功检测了其链霉素的耐药性。JUNG 等^[46]将铜绿假单胞菌置于“正常”“¹³C₆¹⁵N₂ 标记的赖氨酸”以及“¹³C₆¹⁵N₂ 标记的赖氨酸+抗菌药物”培养基中进行培养,用 MALDI-TOF MS 检测了其对于美罗培南、环丙沙星和妥布霉素的敏感性。所以将同位素标记结合抗菌药物运用到 MALDI-TOF MS 对耐药菌的检测中也是一种鉴定病原菌的好方法,但前提是需要已知培养基中含有某种特定的氨基酸,这个过程可能有些烦琐。

2.2.4 内标联合抗菌药物共孵育 内标为分子量稳定且与细菌蛋白的分子量有明显差异的蛋白质,将细菌与抗菌药物共孵育、裂解并加入内标,通过 MALDI-TOF MS 测得质谱峰的分布情况可以将敏感菌与耐药菌区分开来。LANGE 等^[47]利用 MALDI-TOF MS 对肺炎克雷伯菌进行了研究分析,发现当抗菌药物存在时敏感菌质谱图主要包含内标质谱峰,而耐药菌除内标质谱峰外,不论在有或没有抗菌药物存在的条件下均可呈现多个细菌质谱峰,于是可以很好地用于耐药菌的检测。

3 小 结

如今 MALDI-TOF MS 在常规标本病原菌的鉴定和细菌耐药性的检测方面取得了较好的发展,在未来它同样具备很大的潜力,需要研究者不断地优化、发掘。各实验室应建立符合自己实验室的 MALDI-TOF MS 检测体系,规范标本前处理、基质选择等,缩短 TAT,为临床提供准确的检验报告,指导细菌感染患者的救治。但 MALDI-TOF MS 的应用目前也存在许多不足:(1)MALDI-TOF MS 在临床微生物检测的运用上并没有普及化,众多检验科室因各种原因将 MALDI-TOF MS 检测仪器闲置。(2)虽然 MALDI-TOF MS 检测过程中相比常规方法节约成本,但其仪器成本并不低,这也是其无法做到临床普及化的原因之一。(3)由于是对蛋白质进行测定,对于蛋白含量较少的细菌,其标本制备难度较大;对细菌的纯度要求较高,这对难培养细菌的检测造成了困扰。(4)对于亲缘性相近的菌株不能很好地区分。(5)质谱库无法做到完整和统一,需要实验室各自建立适合自己的质谱库,这将是一个浩大的工程,可行性较差。(6)目前 MALDI-TOF MS 只能分别检测细菌对不同抗菌药物的耐药性,不能同时进行药敏分析。(7)MALDI-TOF MS 只能对蛋白质进行定性检测,也就是说只能检测菌株的存在与否,无法通过它得知病原菌的具体含量。

参考文献

- [1] CLARK A E, KALETA E J, ARORA A, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology[J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26: 547-603.
- [2] BLOSSER S J, DRAKE S K, ANDRASKO J L, et al. Multicenter matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry study for identification of clinically relevant *Nocardia* spp[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(5): 1251-1257.
- [3] SALI M, MAIO F D, TARANTINO M, et al. Rapid and safe one-step extraction method for the identification of *Brucella* strains at genus and species level by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. PLoS One, 2018, 13(6): e0197864.
- [4] LI Y, SHAN M, ZHU Z, et al. Application of MALDI-TOF MS to rapid identification of anaerobic bacteria[J]. BMC Infect Dis, 2019, 19: 941-945.
- [5] ALTUN O, BOTERO-KLEIVEN S, CARLSSON S, et al. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by MALDI-TOF MS following short-term incubation on solid media[J]. J Med Microbiol, 2015, 64(11): 1346-1352.
- [6] KÖCK R, WÜLLENWEBER J, HORN D, et al. Implementation of short incubation MALDI-TOF MS identification from positive blood cultures in routine diagnostics and effects on empiric antimicrobial therapy[J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2017, 6: 12-15.
- [7] 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.
- [8] FLORIO W, CAPPELLINI S, GIORDANO C, et al. A new culture-based method for rapid identification of microorganisms in polymicrobial blood cultures by MALDI-TOF MS[J]. BMC Microbiol, 2019, 19: 267-271.
- [9] WANG Y, JIN Y, BAI Y, et al. Rapid method for direct identification of positive blood cultures by MALDI-TOF MS[J]. Exp Ther Med, 2020, 20(6): 235-238.
- [10] HAIKO J, SAVOLAINEN L E, HILLA R, et al. Identification of urinary tract pathogens after 3-hours urine culture by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. J Microbiol Methods, 2016, 129: 81-84.
- [11] LI W, SUN E, WANG Y, et al. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing for urinary tract pathogens by direct analysis of urine samples using a MALDI-TOF MS-based combined protocol[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1182.
- [12] ILKI A A, ÖZSOY S, GELMEZ G, et al. An alternative for urine cultures: direct identification of uropathogens from urine by MALDI-TOF MS[J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 2020, 67(3): 193-197.

- [13] SUN C, ZHANG X, WANG J, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry combined with UF-5000i urine flow cytometry to directly identify pathogens in clinical urine specimens within 1 hour[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(9): 602-605.
- [14] MEDIAVILLA-GRADOLPH M C, DE TORO-PEINADO I, BERMUDEZ-RUIZ M P, et al. Use of MALDI-TOF MS for identification of nontuberculous mycobacterium species isolated from clinical specimens[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 854078.
- [15] LÓPEZ-FABAL M F, GÓMEZ-GARCÁS J L, LÓPEZ-HONTANGAS J L, et al. Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identifying respiratory bacterial pathogens: a fast and efficient method[J]. *Rev Esp Quimioter*, 2015, 28(5): 242-246.
- [16] FERNÁNDEZ-ESGUEVA M, FERNÁNDEZ-SIMON R, MONFORTE-CIRAC M L, et al. Use of MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) for identification of Mycobacterium species isolated directly from liquid medium[J]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2021, 39(5): 241-243.
- [17] 胡燕燕, 蔡加昌, 周宏伟, 等. 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱仪快速鉴别甲氧西林耐药和甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌的研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2015, 35(1): 42-44.
- [18] RHOADS D D, WANG H, KARICHU J, et al. The presence of a single MALDI-TOF mass spectral peak predicts methicillin resistance in staphylococci[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2016, 86(3): 257-261.
- [19] KIM J M, KIM I, CHUNG S H, et al. Rapid discrimination of methicillin-resistant staphylococcus aureus by MALDI-TOF MS[J]. *Pathogens*, 2019, 8(4): 214-217.
- [20] WANG H Y, CHUNG C R, WANG Z, et al. A large-scale investigation and identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus based on peaks binning of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight MS spectra[J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(3): bbaa138.
- [21] 吴薇, 王利君, 隋文君, 等. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术早期筛查耐万古霉素屎肠球菌[J]. *首都医科大学学报*, 2015, 36(3): 444-448.
- [22] 陆文香, 张媛, 王莹超, 等. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术快速鉴定耐万古霉素屎肠球菌[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2017, 27(5): 474-477.
- [23] HUANG T S, LEE S S, LEE C C, et al. Evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry assisted, selective broth method to screen for vancomycin-resistant enterococci in patients at high risk[J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179455.
- [24] NAGY E, BECKER S, SOKI J, et al. Differentiation of division I (cfiA-negative) and division II (cfiA-positive) Bacteroides fragilis strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Med Microbiol*, 2011, 60(Pt 11): 1584-1590.
- [25] ESPINOSA R F, RUMI V, MARCHISIO M, et al. Fast and easy detection of CMY-2 in Escherichia coli by direct MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *J Microbiol Methods*, 2018, 148: 22-28.
- [26] CHANG K C, CHUNG C Y, YE H C H, et al. Direct detection of carbapenemase-associated proteins of Acinetobacter baumannii using nanodiamonds coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Microbiol Methods*, 2018, 147: 36-42.
- [27] ROCCO VG, INTRA J, SARTO C, et al. Rapid identification of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae strains by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight using Vitek® mass spectrometry system[J]. *Eurasian J Med*, 2019, 51(3): 209-213.
- [28] FIGUEROA-ESPINOSA R, COSTA A, CEJAS D, et al. MALDI-TOF MS based procedure to detect KPC-2 directly from positive blood culture bottles and colonies[J]. *J Microbiol Methods*, 2019, 159: 120-127.
- [29] HU Y Y, CAI J C, ZHOU H W, et al. Rapid detection of porins by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry[J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 784.
- [30] PINTO N A, DSOUZA R, HWANG I S, et al. Whole genome and transcriptome analysis reveal MALDI-TOF MS and SDS-PAGE have limited performance for the detection of the key outer membrane protein in carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae isolates[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(49): 84818-84826.
- [31] 涂海健, 黄亚雨, 许光辉, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术对耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌膜孔蛋白检测分析[J]. *中国预防医学杂志*, 2019, 20(10): 925-930.
- [32] DORTET L, BONNIN R A, PENNISI I, et al. Rapid detection and discrimination of chromosome- and MCR-plasmid-mediated resistance to polymyxins by MALDI-TOF MS in Escherichia coli; the MALDIxin test[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73(12): 3359-3367.
- [33] DORTET L, BRODA A, BERNABEU S, et al. Optimization of the MALDIxin test for the rapid identification of colistin resistance in Klebsiella pneumoniae using MALDI-TOF MS[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2020, 75: 110-116.
- [34] BURCKHARDT I, ZIMMERMANN S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours[J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(9): 3321-3324.
- [35] HRABAK J, STUDENTOV V, WALKOV 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.
- [36] 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.

- [37] JOHANSSON A, EKELÖF J, GISKE C G, et al. The detection and verification of carbapenemases using ertapenem and matrix assisted laser desorption ionization-time of flight[J]. BMC Microbiol, 2014, 14: 89-93.
- [38] LASSERRE C, DE SAINT MARTIN L, CUZOU 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.
- [39] CALDERARO A, BUTTRINI M, PIERGIANNI M, et al. Evaluation of a modified meropenem hydrolysis assay on a large cohort of KPC and VIM carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0174908.
- [40] 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.
- [41] PARDO C A, TAN R N, HENNEQUIN C, et al. Rapid detection of AAC(6')-I b-cr production using a MALDI-TOF MS strategy[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35(12): 2047-2051.
- [42] OVIAÑO M, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ J M, PASCUAL Á, et al. Rapid detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant AAC(6)-I b-cr in Enterobacteriaceae by MALDI-TOF MS analysis[J]. J Antimicrob Chemother, 2017, 72(4): 1074-1080.
- [43] JUSTESEN U S, ACAR Z, SYDENHAM T V, et al. Antimicrobial susceptibility testing of Bacteroides fragilis using the MALDI Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay (MBT-ASTRA)[J]. Anaerobe, 2018, 54: 236-239.
- [44] SPARBIER K, LANGE C, JUNG J, et al. MALDI biotyper-based rapid resistance detection by stable-isotope labeling[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(11): 3741-3748.
- [45] DEMIREV P A, HAGAN N S, ANTOINE M D, et al. Establishing drug resistance in microorganisms by mass spectrometry[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2013, 24(8): 1194-1201.
- [46] JUNG J S, EBERL T, SPARBIER K, et al. Rapid detection of antibiotic resistance based on mass spectrometry and stable isotopes[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014, 33(6): 949-955.
- [47] LANGE C, SCHUBERT S, JUNG J, et al. Quantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid resistance detection[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(12): 4155-4162.

(收稿日期: 2021-03-19 修回日期: 2022-03-03)

• 综 述 •

肠道微生态平衡监测对妊娠高血压疾病的诊断价值*

罗云桃, 黄维纲 综述, 赵 冉[△] 审校
上海市临床检验中心, 上海 200126

摘 要: 妊娠高血压疾病是孕产妇和婴儿病死率增高的主要原因。然而临床上对于该类疾病的病因和发病机制并不十分清楚, 除了评估孕妇血压水平、蛋白尿、器官受累程度及胎儿情况之外, 缺乏有效的实验室预防、监测及诊疗手段。而肠道菌群作为人体最大的微生态系统, 相关研究成果已在各类疾病中显现出巨大的临床潜在价值。相比之下, 肠道菌群与妊娠高血压疾病的研究相对滞后。由于孕妇体质、代谢等状况的特殊性, 疾病与肠道菌群变换叠加的病理过程更为复杂。目前, 相关研究虽有报道, 但在两者相互关系、致病机制等方面分析并不完整、全面。本文对肠道微生态与妊娠高血压疾病的多项研究结果进行综述, 并分析了妊娠高血压疾病的研究现状以及相关实验室监测指标的应用价值, 探讨了肠道菌群作为妊娠高血压疾病新型标志物的可行性, 为临床上对妊娠高血压疾病的诊断提供了新思路。

关键词: 妊娠高血压; 肠道菌群; 临床检测; 生物标志物

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2022.11.023

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2022)11-1389-06

文献标志码: A

Diagnostic value of intestinal microecologic balance monitoring in pregnancy-induced-hypertension*

LUO Yuntao, HUANG Weigang, ZHAO Ran[△]

Shanghai Clinical Laboratory Center, Shanghai, 200126, China

Abstract: Pregnancy-induced-hypertension (PIH) is a leading cause of mortality rate increase in pregnant women and infants. However, the etiology and pathogenesis of PIH is still unclear in clinic. Beside of evaluating the blood pressure level, proteinuria, degree of organ involvement and fetal condition, there is a lack of the

* 基金项目: 上海临床检验中心自选课题(2020ZXKT-03、2021ZXKT-06)。

[△] 通信作者, E-mail: zhaoran@sccl.org.cn.

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20220419.1526.005.html> (2022-04-20)