

基于微生物快速鉴定系统对金黄色葡萄球菌耐药性鉴定 新评估方法的建立

姜童童¹, 田桂杰², 李贤煜³, 王毅³, 李悦怡¹, 邢亚君³, 孙娅楠³, 马淑骅³,
周金鹤¹, 杨伟峰^{3*}, 何忠梅^{1*}

(1. 吉林农业大学, 长春 130000; 2. 四平市铁西区卫生健康局, 吉林 四平 136000;
3. 中国中医科学院医学实验中学, 北京 100700)

[摘要] **目的:** 探讨微生物快速鉴定系统(MALDI-Biotyper System)用于快速鉴定铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, *P. a*), 临床分离金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. a*) 耐药性情况的可行性。**方法:** 通过采用微生物快速鉴定系统及肉汤稀释法进行鉴定质控、临床分离金黄色葡萄球菌的耐药性情况, 并将微生物快速鉴定系统检测结果与肉汤稀释法最低抑菌浓度(MIC)值进行比较分析, 最后通过同步鉴定铜绿假单胞菌耐药性情况确定微生物快速鉴定系统的准确性及适用性。**结果:** 微生物快速鉴定系统评分鉴定结果显示敏感质控菌株金黄色葡萄球菌评分值大于2.000, 耐药质控菌株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *S. a*, MRSA)评分值在1.700~2.000。临床分离金葡菌评分鉴定结果均在1.700~2.000, 显示耐药, 与肉汤稀释法 MIC 值结果一致。同时, 无关质控敏感菌株铜绿假单胞菌的系统评分鉴定值大于2.000, 显示敏感, 其本身为敏感菌株, 结果一致。**结论:** 微生物快速鉴定系统评分方法可以用于金黄色葡萄球菌及铜绿假单胞菌耐药性情况的快速鉴定。

[关键词] 金黄色葡萄球菌; 铜绿假单胞菌; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 肉汤稀释法; 微生物快速鉴定系统

[中图分类号] R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)10-0128-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201016

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20200207.1710.010.html>

[网络出版时间] 2020-02-07 17:36

Establishment of a New Evaluation Method for Identification of Drug Resistance of *Staphylococcus aureus* Based on Rapid Identification System of Microorganisms

JIANG Tong-tong¹, TIAN Gui-jie², LI Xian-yu³, WANG Yi³, LI Yue-yi¹, XING Ya-jun³,
SUN Ya-nan³, MA Shu-hua³, ZHOU Jin-he¹, YANG Wei-feng^{3*}, HE Zhong-mei^{1*}

(1. Jilin Agricultural University, Changchun 130000, China;

2. Siping Tiexi District Health and Health Bureau, Siping 136000, China;

3. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the feasibility of the rapid identification system (MALDI-Biotyper System) of microorganisms for rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* and clinical isolation of *Staphylococcus aureus*. **Method:** Identification quality control and clinical isolation were conducted for drug resistance of *S. aureus* by microbial rapid identification system and broth dilution method. The scores of microbial

[收稿日期] 20200109(011)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81373884); 财政部基本科研业务经费项目(Y201701, ZZ0808011, ZZ2014004, ZZ2016011); 国家自然科学基金青年科学基金项目(81603285); 北京市自然科学基金项目(7132157); 上海凯宝药业院士工作站项目(HX2017001)

[第一作者] 姜童童, 在读硕士, 从事临床分离菌耐药性及其机制研究, E-mail: 1849333208@qq.com

[通信作者] * 杨伟峰, 副研究员, 从事中药抗菌活性成分及机制研究, Tel: 010-64089506, E-mail: sunzhuyang@126.com;

* 何忠梅, 教授, 硕士研究生导师, 从事中药有效成分、作用机制研究及产品开发, Tel: 0431-84533358, E-mail: heather78@126.com

rapid identification system were compared with the MIC value of broth dilution method. The drug resistance of *P. aeruginosa* was simultaneously identified to determine the accuracy and applicability of the rapid identification system of microorganisms. **Result:** The scores of the microbial rapid identification system showed that the score of sensitive quality control strain *S. aureus* was higher than 2.000, and the that of resistant strain of methicillin-resistant *S. aureus* (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) was between 1.700 and 2.000. The score of clinically isolated *S. aureus* was between 1.700 and 2.000, which suggested the drug resistance and was consistent with the MIC value of the broth dilution method. At the same time, the systemic identification value of the *P. aeruginosa*, which is independent of the quality control sensitive strain, was greater than 2.000, showing sensitivity and it was a sensitive strain itself, which was consistent with the results. **Conclusion:** The microbial rapid identification system scoring method can be used for the rapid identification of the drug resistance of *S. aureus* and *P. aeruginosa*.

[**Key words**] *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; microdilution method; MALDI Biotyper System

目前临床及实验室中进行细菌药物敏感性试验最常用的方法有纸片扩散法、肉汤稀释法、浓度梯度法和 E-test 法等^[1]。此外还有一些基于聚合酶链式反应(PCR)技术建立的鉴定分类方法^[2]。传统方法虽然能够满足临床大部分需要,但这些方法仍然存在一些不足,例如这些方法往往需要经过细菌培养、接种等一系列操作步骤,检测周期长、操作繁琐,且不是所有的病原菌都可以在离体培养体系中生长繁殖,漏检可能性大。结果的判读大多借助于肉眼,具有主观性强、准确度及灵敏度低、特征性差等缺点。因此,在抗感染领域,无论是临床还是基础研究,都亟需一种快速、准确、全面进行细菌种类及耐药情况的鉴定方法。

质谱技术^[3]做为一种广泛应用于各个学科领域通过制备、分离、检测气相离子来鉴定化合物的一种专门技术,被认为是一种同时具备高特异性和高灵敏度的方法,1975年,质谱技术首次报道应用于细菌的快速鉴定^[4-5]。

首款基于基质辅助激光解吸电离(MALDI)质谱为基础的微生物鉴定商品化仪器微生物快速鉴定系统(MALDI-Biotyper System)于2014年在中国通过国家食品药品监督管理总局(CFDA)批准上市。MALDI-TOF质谱技术已广泛应用于生命科学及相关领域,而作为检测和鉴定多肽、蛋白质等生物因子的有效工具,在微生物鉴定检验中的研究及应用逐步重要,MALDI-TOF质谱作为一种快速和准确的检测技术,已广泛应用于细菌的鉴定和分类,这将对细菌的快速、准确和实时鉴定具有重要意义^[6]。使用MALDI-Biotyper System直接挑取单菌落点靶,仅需2~3 min便可鉴定微生物,无需二次孵育步骤,且该

检测方法没有生化测试的局限性,可以分析以前标准常规微生物学技术难以鉴定的物种^[7-8]。通过Biotyper软件对获得的指纹谱图进行处理并和数据库中各已知微生物的标准指纹图谱进行匹配,从而完成对微生物的鉴定^[9]。目前该仪器可快速鉴定超过6700种微生物,包括革兰阴性菌、革兰氏阳性菌、厌氧菌和酵母菌。

随着临床抗菌药物的广泛应用,临床耐药菌的检出日益增多,这也是目前临床面临的一个重要问题,如果可以快速识别耐药菌及其菌种^[10],对于临床抗菌药物可以进行更快速、更准确地选择,对临床治疗更具重要意义,所以,探寻一种快速鉴定临床分离菌株耐药状况的方法是日益迫切的。

应用MALDI-TOF分析方法可实现在细菌属、种以及不同菌株水平上对细菌快速、准确地区分和鉴定,显示出广泛的应用前景,基于已建立的MALDI-TOF分析方法对细菌的鉴定检验的研究结果可为更多植物、食品中致病菌的质量指纹图谱数据库的建立奠定基础的作用。

本实验中,使用MALDI-Biotyper System首先对已知标准菌株(敏感菌株和耐药菌株)和无关质控敏感铜绿假单胞菌进行系统评分测定,在此基础上对临床分离菌株进行评分以鉴定临床分离菌株耐药状况。最后与肉汤稀释法最低抑菌浓度(MIC)进行对比验证,确定MALDI-Biotyper System对临床分离菌株耐药状态快速鉴定的可行性,为临床预防及治疗提供更为直接、可靠的依据。

1 材料

SW-CJ-1FD型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),THZ-D型恒温振荡培养箱(苏州培英实

验设备有限公司), KBF-240 型恒温培养箱(上海森信实验仪器有限公司), V-1100 型紫外分光光度计(上海美普达仪器有限公司), 770006 型高压灭菌锅(Sanyo), BT25S 型 1/10 万分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司], TOF200 型 MALDI-Biotyper 软件(Bruker)。

标准敏感菌株金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, S. a, 批号 ATCC25923); 耐药质控菌株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA, 批号 ATCC43300); 无关质控敏感铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, P. a, 批号 ATCC27853); 其中 S. a, MRSA, P. a 均来源美国 ATCC 菌株保藏中心。临床分离金黄色葡萄球菌(编号 1~6)为北京中医药大学东直门医院临床分离菌株, 1, 2 为血液来源, 3~6 为痰液来源样本。

磺胺甲恶唑(Sulfamethoxazole, SXT, 批号 100025-201505), 头孢西丁(Cefoxitin, FOX, 批号 130572-201603), 苯唑西林(Oxacillin, OX, 批号 130482-201402), 阿莫西林(Amoxicillin, AML, 批号 130409-201512), 克林霉素(Clindamycin, DA, 批号 130422-201306), 庆大霉素(Gentamycin, CN, 批号 130515-201603), 氨苄西林(Ampicillin, AMP, 批号 130410-201207), 阿米卡星(Ampicillin, AK, 批号 130335-200204), 妥布霉素(Tobramycin, TOB, 批号 130340-201203), 环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP, 批号 130451-201203), 四环素(Tetracyclines, TE, 批号 130306-201419), 链霉素(streptomycin, SM, 批号 130308-201514), 卡那霉素(Kanamycin, KANA, 批号 130556-201502), 以上药物均购自中国食品药品检定研究院; 青霉素(penicillin, P, Inalco, 批号 R2/231/213), 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑(2, 3, 5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride, TTC, 批号 17779-10X10ML-F, Sigma), α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA), MH 肉汤培养基, MH 琼脂培养基(批号 1765821, 2148329, Oxoid), 哥伦比亚血琼脂基础(Oxoid)。

2 方法

2.1 肉汤稀释法 检测 MRSA 及各临床分离菌株的最低抑菌浓度(minimal inhibitory, MIC)。

2.1.1 菌株活化 将保存的 MRSA 及各临床分离菌株于 MH 肉汤培养基中 37 °C 恢复培养 16~18 h, 接种于 MH 琼脂平板 37 °C 培养 16~24 h, 使细菌形成 1 mm 大小菌落备用。使用时将其重新接种

于 MH 肉汤培养基中 37 °C 恢复培养 16~18 h, 备用。

2.1.2 MIC 值的测定方法^[11] 采用标准肉汤稀释法分别测定 MRSA 及各临床分离菌的 MIC, 抗菌药物包括 AK, KANA, CN, AML, AMP, TOB, SXT, DA, FOX, OX, CIP, SM, P, TE。取无菌 96 孔平底微量板, 按照溶液 2 倍稀释法稀释上述药液 100 μ L。然后加入终 A_{600} 为 0.01 的各菌液 100 μ L, 置 37 °C 恒温恒湿培养 16~24 h, 同时设置阳性孔(100 μ L 菌液, 100 μ L MH 肉汤培养基), 阴性孔(200 μ L 空白 MH 肉汤培养基)共培养。最后, 每孔加入 0.25% TTC 溶液 30 μ L, 继续培养 0.5 h, 显现红色为有菌生长, 阴性对照孔为参照前提下, 判断药物的 MIC。记录结果, 每次实验重复 3 次记平均值。

2.2 MALDI Biotyper System 分析检测

2.2.1 鉴定方法^[12] 将所述待测 S. a, MRSA, P. a 及各临床分离菌分别接种到固体培养基上培养成单菌落, 挑取单菌落涂布于所述 MALDI-TOF 质谱仪靶盘圆点处, 涂布厚度大于 0 mm 且小于 1 mm, 室温干燥, 然后覆盖基质(CHCA), 重复 10 次。此外, 在样品盘空白校准孔上滴加蛋白肽校准物。

采用 MALDI-TOF/TOF 质谱仪对待测金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌进行检测, 获得特征性 MALDI 指纹图谱; 将获得的特征性 MALDI 指纹图谱与 Biotyper 自带数据库特征序列进行比对。

其中, 采用所述 MALDI-TOF/TOF 质谱仪对所述待测金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌进行检测时设置参数为 Shots 为 500, 激光能量 85%, 谱图采集范围 m/z 200~20 000。

2.2.2 数据判断 参考 Kazuyuki Sogawa 实验方法, 待测铜绿假单胞菌和临床分离金葡菌是否耐药判断方法如下, 采用 Biotyper 软件自带数据库与所获得特征性 MALDI 指纹图谱进行比对, 若所得菌株鉴定分值大于等于 2.000 分, 表明该菌特征性 MALDI 指纹图谱与 Biotyper 软件数据库特征序列完全匹配, 即所测金黄色葡萄球菌不为耐药菌株(或候选为药物敏感菌株); 若所得菌株鉴定分值小于 2.000 分而大于 1.700 分, 表明该菌特征性 MALDI 指纹图谱与 Biotyper 软件数据库特征序列匹配度略低, 即待测金黄色葡萄球菌为耐药菌株(或候选为耐药菌株); 若所得菌株鉴定分值小于 1.700 分, 表明该菌特征性 MALDI 指纹图谱与 Biotyper 软件数据库特征序列不匹配, 即所述结果不可靠^[12], 如图 1, 需结合肉汤稀释法等传统鉴定方法再次验证。

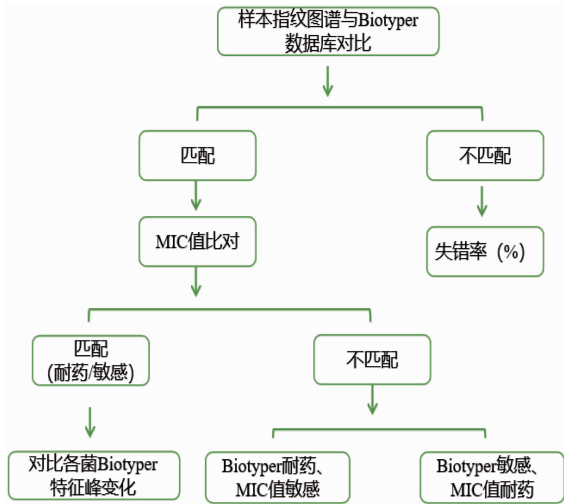


图 1 基于 MALDI-Biotyper System 结果判读流程
Fig. 1 Flow chart based on MALDI-Biotyper System results

表 1 抗生素对各菌株 MICs (平均值)

Table 1 MICs (average) of antibiotics against each strain

mg·L⁻¹

种类	抗生素	实验菌株							CLSI 非耐药质控范围
		MRSA	1	2	3	4	5	6	
磺胺类	SXT	1 024	128	2 048	2 048	2 048	2 048	2 048	0.5 ~ 2
β-内酰胺类	FOX	64	256	1 024	1 024	256	512	512	1 ~ 4
	P	128	64	32	64	2 048	32	32	0.25 ~ 2
	OX	128	1 024	1 024	2 048	1 024	1 024	1 024	0.12 ~ 0.5
	AML	128	32	1 024	64	2 048	512	32	0.12 ~ 0.5
	AMP	128	32	1 024	32	2 048	512	32	0.5 ~ 2
氨基糖苷类	CN	512	512	1 024	512	1 024	256	512	0.12 ~ 1
	KANA	1 024	1 024	2 048	2 048	1 024	32	4 096	1 ~ 4
	AK	512	4 096	1 024	256	512	256	256	1 ~ 4
	SM	32	2 048	16	2 048	1 024	256	512	1 ~ 4
	TOB	2 048	2 048	2 048	512	1 024	256	1 024	0.12 ~ 1
林可酰胺类	DA	1 024	64	2 048	2 048	0.25	2 048	2 048	0.06 ~ 0.25
喹诺酮类	CIP	128	256	128	256	256	128	128	0.12 ~ 0.5
四环素类	TE	0.125	32	32	64	64	32	32	0.12 ~ 1

注:1,2 为血液来源,3~6 为痰液来源样本。

由表 2 结果可知,质控菌株 *S. a* 的特征性 MALDI 指纹图谱与所述 Biotyper 软件数据库特征序列匹配度高,见图 2, MALDI-Biotyper System 评分值均大于 2.000,结合前述判断方法,即该菌株为敏感菌株;质控菌株 MRSA 的特征性 MALDI 指纹图谱与所述 Biotyper 软件数据库特征序列匹配较低,见图 3, MALDI-Biotyper System 评分值均在 1.700 ~ 2.000,结合前述判断方法,即该菌株为耐药菌株。

3 结果

3.1 各耐药菌株 MICs 检测 由表 1 可知,根据 CLSI 2018 版 M02-A10 文件-纸片扩散试验(金黄色葡萄球菌 ATCC25923)标准,以上 14 种抗菌药物的 MICs 均超出 CLSI 质控范围^[13],提示上述 6 株临床获得金葡菌均为耐药菌株且均表现为多重耐药。此实验质控菌株分别为敏感金葡菌(*S. a*)和敏感铜绿假单胞菌(*P. a*),均为敏感菌株。

3.2 MALDI-Biotyper System 分析评分测定 由表 2 可知,使用 MALDI-Biotyper System 对质控敏感菌株 *S. a* 的评分值大于 2.000;对质控耐药菌株评分值处于 1.700 ~ 2.000。由表 3 可得,基于 MALDI-Biotyper System 对 6 株临床分离菌的评分值均在 1.700 ~ 2.000,与质控耐药菌 MRSA 评分表现一致,显示为金黄色葡萄球菌耐药菌。

基于以上质控菌株的检测结果可知, MALDI-Biotyper System 评分鉴定方法是可靠的。在此基础上,对 6 株临床分离菌株进行快速鉴定。由表 3 评分结果可知,其 MALDI-Biotyper System 评分值均在 1.700 ~ 2.000,结合前述判断方法,判读以上 6 株临床分离菌为金黄色葡萄球菌耐药菌,结合传统鉴定方法 MIC 结果,确定均为耐药菌株,其特征性 MALDI 指纹图谱与所述 Biotyper 软件数据库特征序

表 2 MALDI-Biotyper System 对质控菌株评分值 (log)

Table 2 MALDI-Biotyper System scores on quality control strains (log)

重复次数	<i>S. a</i>	MRSA
1	2.097	1.655
2	2.081	1.839
3	2.119	1.857
4	2.091	1.727
5	2.091	1.660
6	2.079	1.895
7	2.079	1.852
8	2.084	1.873
9	2.083	1.790
10	2.153	1.868

表 3 MALDI-Biotyper System 对临床分离菌评分值 (log)

Table 3 MALDI-Biotyper System scores on clinical isolates (log)

重复次数	1	2	3	4	5	6
1	1.845	1.826	1.775	1.764	1.845	1.718
2	1.727	1.828	1.902	1.773	1.881	1.779
3	1.779	1.787	1.882	1.848	1.876	1.819
4	1.819	1.894	1.854	1.837	1.821	1.767
5	1.712	1.893	1.810	1.763	1.788	1.714
6	1.767	1.765	1.899	1.793	1.870	1.735
7	1.714	1.781	1.893	1.812	1.789	1.761
8	1.709	1.770	1.768	1.826	1.804	1.789
9	1.735	1.746	1.770	1.744	1.802	1.793
10	1.761	1.878	1.895	1.786	1.793	1.759

列匹配情况见图 4~9。基于以上结果,可以看出,使用 MALDI-Biotyper System 对临床分离菌耐药状况进行的快速鉴定无不匹配情况,准确度高且快速。

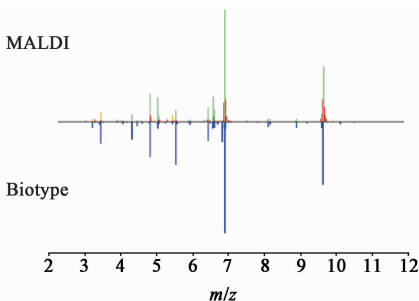


图 2 质控菌株 *S. a* 特征指纹谱对比

Fig. 2 Comparison of characteristic fingerprints of quality control strain *S. a*

对比图 10~12 中谱峰变化可以看出,位于 m/z 9 640.0, 6 890.0, 4 810.0, 4 310.0, 2 640.0 左右的

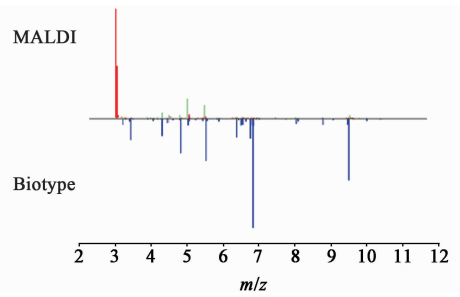


图 3 质控菌株 MRSA 特征指纹谱对比

Fig. 3 Comparison of quality fingerprints of quality control strain MRSA

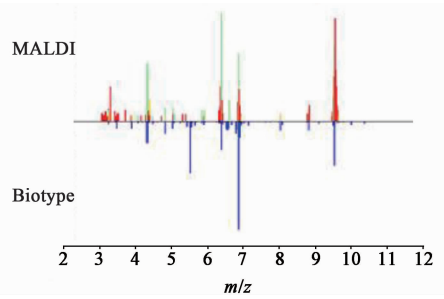


图 4 临床分离菌 1 特征指纹谱对比

Fig. 4 Comparison of characteristic fingerprints of clinical isolates 1

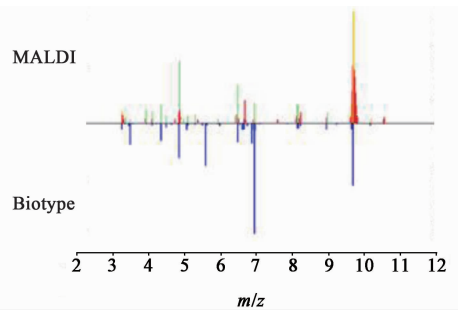


图 5 临床分离菌 2 特征指纹谱对比

Fig. 5 Comparison of characteristic fingerprints of clinical isolates 2

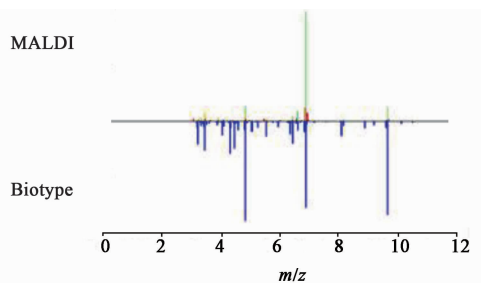


图 6 临床分离菌 3 特征指纹谱对比

Fig. 6 Comparison of characteristic fingerprints of clinical isolates 3

分子离子峰可表征金黄色葡萄球菌的特征峰;位于 m/z 8 900.0, 8 100.0, 3 800.0 左右的分子离子峰不存在于敏感 *S. a* 中,但是存在于耐药 MRSA 和 6 株临床分离菌中,推测这些特征峰是与细菌耐药密切

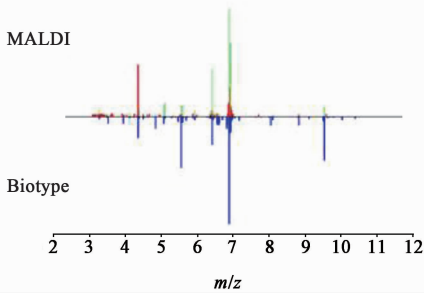


图 7 临床分离菌 4 特征指纹谱对比
Fig. 7 Comparison of characteristic fingerprints of clinical isolates 4

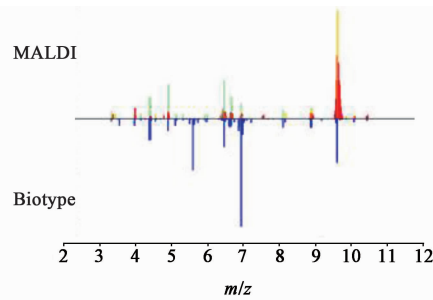


图 8 临床分离菌 5 特征指纹谱对比
Fig. 8 Comparison of characteristic fingerprints of clinical isolates 5

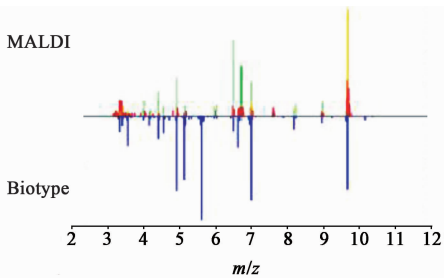


图 9 临床分离菌 6 特征指纹谱对比
Fig. 9 Comparison of characteristic fingerprints of clinical isolates 6

相关的特征峰。此外,比较图 11,12,结合微量稀释法 MIC 测定结果,6 株临床分离菌相比质控 MRSA 多了 m/z 15 100.0,10 120.0 等分子离子峰,结合表 1 MIC 结果,发现质控 MRSA 对四环素类及部分 β -内酰胺类、氨基糖苷类抗生素相对敏感,其 MIC 较低的,所以可以推测 m/z 15 100.0,10 120.0 等峰是与细菌耐以上所述抗生素密切相关的特征峰。

同为耐药的 6 株临床分离菌株,相对于临床分离菌 2,3,5,6,分离菌 1,4 缺少位于 m/z 11 500.0,10 500.0 等特征峰,结合表 1 MIC 值结果,分离菌株 1,4 对林可酰胺类抗生素的 MIC 较于分离菌 2,3,5,6 较低,所以推测谱峰 m/z 11 500,10 500 是耐林可酰胺类抗生素的特征峰,其 MALDI-Biotyper 软件数据库特征谱峰见图 12。同时,对于 β -内酰胺类抗生素,临床分离菌 4 的 MIC 相对其他 5 个临床分离

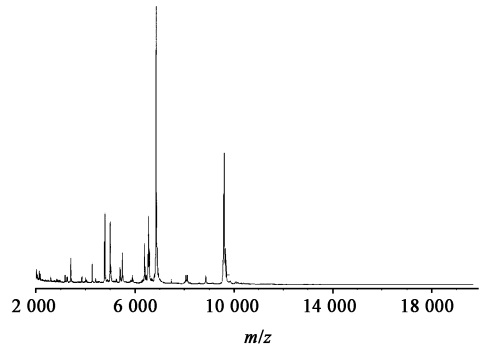


图 10 质控 *S. a* 菌株特征谱
Fig. 10 Quality control *S. a* strain characteristic map

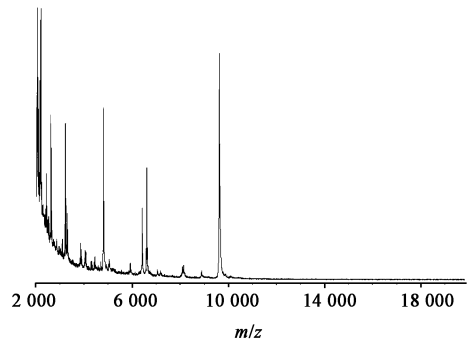


图 11 质控 MRSA 菌株特征谱
Fig. 11 Quality control MRSA strain characteristic map

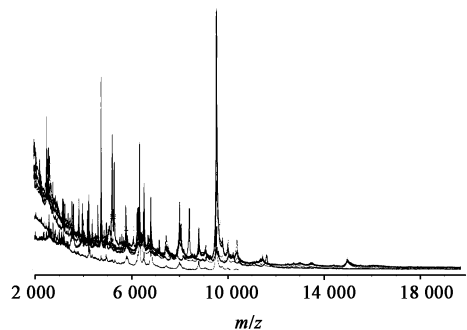


图 12 6 株临床分离菌特征谱
Fig. 12 Characteristic map of 6 clinical isolates

菌的 MIC 更大,即耐药性更强,推测峰 m/z 3 260.0, 2 340.0 是与耐 β -内酰胺类抗生素相关的特征峰,其 MALDI-Biotyper 软件数据库特征谱峰见图 12,所涉及相关蛋白与抗生素耐药性之间的关联性我们将在后续实验中进行相关研究。

实验中,设定无关质控敏感铜绿假单胞菌,其 MALDI-Biotyper System 评分值大于 2.000,结合前述判断方法,显示该菌为敏感菌株,其特征性 MALDI 指纹图谱与所述 Biotyper 软件数据库特征序列匹配情况,见图 13。所对应分子离子峰与金葡萄类菌株分子离子峰有明显差别,见图 14,即使用 MALDI-

Biotyper System 不仅可以得到菌株耐药状况还可以准确对细菌种属进行鉴别。

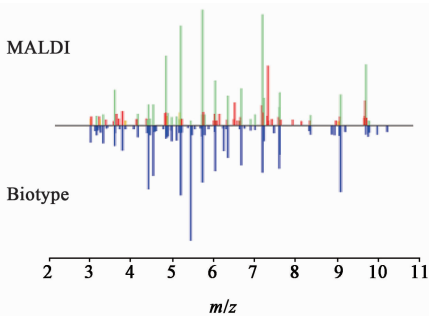


图 13 敏感菌株铜绿假单胞菌特征指纹图谱对比图(无关菌株)
Fig. 13 Comparison of sensitive fingerprints of *Pseudomonas aeruginosa* strains (unrelated bacteria)

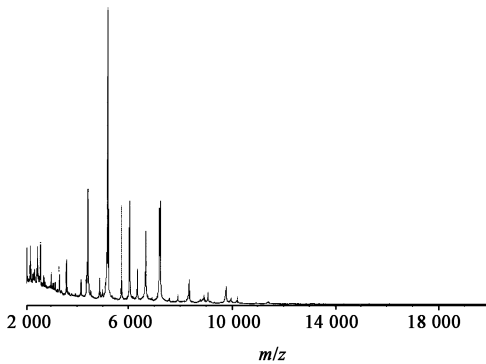


图 14 铜绿假单胞菌特征图谱(无关细菌)
Fig. 14 *Pseudomonas aeruginosa* characteristic map (unrelated bacteria)

4 讨论

金黄色葡萄球菌是一种常见的革兰阳性菌,存在于皮肤表面及上呼吸道黏膜,可引起皮肤、黏膜及多种组织器官的化脓性炎症反应。美国疾病控制中心报告,由金黄色葡萄球菌引起的感染占第二位,仅次于大肠埃希菌^[14]。随着抗生素的广泛应用,MRSA 数量随之增加,MRSA 不但耐药率高,而且呈多重耐药性,强传染性,由该菌所致的败血症和脓血症仍居这两种疾病的首位,是医源性感染的主要感染源,有“超级细菌”之称。铜绿假单胞菌是一种常见的条件致病菌,属于非发酵革兰氏阴性杆菌,现已发生耐药及多重耐药性,也是医院内感染的主要病原菌之一。所以,快速可靠地鉴定细菌耐药性及耐药性变化作为微生物学中的关键任务之一,即可帮助分析耐药性流行演变趋势,同时对合理选择治疗药物、提高临床疗效也至关重要。

对于使用分子生物学技术如 PCR 技术在细菌耐药性检测方面的使用中,往往是对于耐药基因

mecA 的检测^[15],但是它仅确定细菌中是否存在 *mecA* 基因,但不能完全确定细菌表现为耐药,因为 *mecA* 编码蛋白的量的多少也会影响到细菌性表型的差异,且可获得信息量少^[4]。当今仅仅少部分基因方法经过了全面的临床实验验证。随着现在更多耐药现象及机制的发生,此方面方法的使用也受到一定的局限。此外 PCR 技术需要提取分离提取细菌的特定基因片段,所以实验步骤繁琐且难以控制实验样品容易被污染,不能准确测定耐药表型,并不适合对细菌的耐药性及耐药性的变化进行快速准确鉴别。

在本研究中所使用的 MALDI-Biotyper System 方法^[16]需要的样品量少,可以在几分钟内从样品中得到结果,这为细菌的耐药性研究提供了一种新的快速检测方法。基于表 2,3 中多次重复数据可得,利用 MALDI-Biotyper System 分析方法鉴定细菌耐药性是具有良好的重复性及可靠性的,其次,大量的研究表明,MALDI-Biotyper System 不仅可以确定质控菌株的耐药情况、鉴定临床分离菌的耐药性^[17],还可以通过其特征谱图峰值找寻相关耐药抗生素,相比于传统鉴定方法和 PCR 等方法,可以更快速、更准确的获得对抗生素的耐药情况,充分显示了其高精度、高灵敏及高可信度的特点^[18]。而且,对于不同种类细菌,如实验中所述金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌,使用 MALDI-Biotyper System 也是可以快速进行区分鉴别并确定其耐药情况。对于其他菌株,如大肠埃希菌、李斯特菌、沙门氏菌等均可以实现区分和鉴定^[7],目前,我们对其他临床常见致病菌诸如铜绿假单胞菌的耐药性相关研究后续进行中,笔者还将继续进行探讨。

基于 MALDI-Biotyper System 的高速性、高通量性及稳定性,使其在很多国内外实验室细菌耐药性的快速鉴定试验中占有不可取代的地位,而且现在临床实验室中也得到广泛应用^[19]。在 MALDI-Biotyper System 中,不仅可以创建自己所需数据库,而且可以利用 Biotyper 软件编译目的微生物条目,提供了非常快速和特异性的微生物鉴定。用于特征蛋白指纹图谱比较和统计数据解释的复杂生物信息学使用户能够通过自主创建、修改和组织参考光谱数据库来优化微生物分类过程及快速检测鉴定微生物菌种和其耐药程度。

综上所述,基于 MALDI-Biotyper System 技术对实验室、临床中细菌耐药性快速鉴定具有极大的可行性及适用性,可以满足实验室、临床或其他行业对

细菌耐药性快速鉴定的迫切需求。

[参考文献]

- [1] 杨华为,蒋迪,王璨,等. 细菌鉴定和耐药性检测方法的发展[J]. 临床药物治疗杂志,2006,4(4):39-44.
- [2] 曹俊敏,杨雪静,王原. 棒杆菌属细菌分类鉴定的方法学比较及对四环素与大环内酯类抗菌药物耐药机制的研究[J]. 中华医院感染学杂志,2013,23(2):241-244.
- [3] MARTIN A C, SIMON N D, VALERIA E-J, et al. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry [J]. Nature Biotechnol, 1996 (14) : 1584-1586.
- [4] 孙宗科,张伟,陈西平,等. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱快速鉴定耐甲氧西林金黄色葡萄球菌[J]. 卫生研究,2011,40(3):375-378.
- [5] 石柱英,孙宗科,陈西平,等. 应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱检测细菌耐药性的初步研究[J]. 卫生研究,2008,37(1):82-85.
- [6] 其布勒哈斯. 应用 MALDI-TOF 质谱技术分析和鉴定食源性致病菌研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2009.
- [7] ZHU W M, SIERADZKI K, ALBRECHT V, et al. Evaluation of the Biotyper MALDI-TOF MS system for identification of *Staphylococcus* species [J]. J Microbiol Methods, 2015, 117(2015):14-17.
- [8] 张欣怡,刘朝阳. MALDI Biotyper 微生物快速鉴定与分类新技术[C]//2012 中国食品与农产品质量安全检测技术应用国际论坛暨展览会论文集,2012-06-06,中国北京:出版社不详,2012:59-60.
- [9] S Q VAN VEEN, CLAAS E C, KUIJPER E J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories [J]. J Clin Microbiol, Mar, 2010, 48 (3) : 900-907.
- [10] 谢艳斌. 不同来源金黄色葡萄球菌的分布特征及耐药性分析 [J]. 检验医学与临床, 2018, 15 (20) : 3082-3084.
- [11] 刘珏玲. 痰热清注射液对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的作用及机制研究 [D]. 北京:中国中医科学院,2017.
- [12] KAZUYUKI S, MASA HARU W, KENICHI S. Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 400(7):1905-1911.
- [13] 金虹,李海帅,帖金凤,等. 应用微量稀释法测定消毒剂最小抑菌浓度方法的建立 [J]. 中国消毒学杂志, 2018, 35(11):801-804.
- [14] 代晓航,郭灵安,魏超. 金黄色葡萄球菌肠毒素 A、B、C 在草莓中表达的研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(9):3516-3520.
- [15] HACKBARTH C J, CHAMBERS H F. Methicillin-resistant staphylococci: genetics and mechanisms of resistance [J]. Antimicrobial Agents Chemother, 1989, 33(7):991-994.
- [16] WANG S S, WANG Y J, ZHANG J, et al. Using MALDI-TOF MS coupled with a high-mass detector to directly analyze intact proteins in thyroid tissues [J]. Sci Chin, 2018, 61(7):871-878.
- [17] WAN D, CHEN Q, GAO M X, et al. Combination of extraction tip and MALDI-TOF-MS for efficient separation and analysis of cysteine-containing peptides [J]. Sci China Chem, 2014, 57(5):703-707.
- [18] 李楠,刘文森,刘林娜,等. MALDI-TOF 质谱技术及 Biotyper 数据库在养殖场空气微生物鉴定中的应用 [J]. 中国兽医学报, 2014, 34(12):2031-2034.
- [19] FENSELAU C, DEMIREV P A. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry [J]. Mass Spectrom Rev, 2001, 20(4):157-171.

[责任编辑 顾雪竹]