

# MALDI - TOF MS 快速检测血流感染大肠杆菌对第 3 代头孢菌素的药敏研究

刘春林 黄德兵 吴清念 蔡 甜

**摘要** 目的 评价基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (matrix - assisted laser desorption ionization - time of flight, MALDI - TOF MS) 直接靶板微滴生长法 (direct - on - target microdroplet growth assay, DOT - MGA) 快速检测血流感染大肠杆菌对第 3 代头孢菌素药敏实验的价值。方法 收集血流感染大肠杆菌 50 株作为实验菌株。采用菌液与不同浓度头孢噻肟在靶板上混合作为检测孔, 不加抗菌药物的菌液作为生长对照孔, 孵育 4h 后, 根据 DOT - MGA 法鉴定靶板上的待测菌, 所对应检测孔位代表头孢噻肟最低抑菌浓度, 并以微量肉汤稀释法作为比较。结果 微量肉汤稀释法和 DOT - MGA 法检测大肠杆菌对头孢噻肟最低抑菌浓度基本一致率为 96%, 分类一致率为 94%, 较大偏差为 2%, 次要偏差为 4%, 未发现重大偏差, 均在临床可接受范围内。结论 MALDI - TOF MS 结合 DOT - MGA 法能够短时间内准确提供大肠杆菌对第 3 代头孢菌素的药敏信息, 为临床早期精准管理血流感染患者提供依据。

**关键词** 直接靶板微滴生长法 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 血流感染 第 3 代头孢菌素 最低抑菌浓度  
中图分类号 R44 文献标识码 A DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2023.10.029

**Rapid Detection of the Third Generation Cephalosporins Sensitivity Test of Escherichia Coli Causing Blood Stream Infection by MALDI - TOF MS.** LIU Chunlin, HUANG Debing, WU Qingnian, et al. Department of Clinical Laboratory, The Sixth Affiliated Hospital, School of Medicine, South China University of Technology, Guangdong 528200, China

**Abstract Objective** To evaluate the value of Matrix - assisted laser desorption ionization - time of flight (MALDI - TOF MS) with direct - on - target microdroplet growth assay (DOT - MGA) method for rapid detection the third generation cephalosporins sensitivity test of Escherichia coli causing blood stream infection. **Methods** Fifty strains of blood stream infected causing by Escherichia coli were collected as experimental strains. The bacterial solution and cefotaxime of different concentrations were mixed on the target plate as the detection spots, and the bacterial solution without antibacteria was used as the growth control. After incubation for 4 - hour, the bacteria on the target plate were identified according to DOT - MGA method. The corresponding detection spots position was used to represent the minimum inhibitory concentration (MIC) of cefotaxime, and the micro - broth dilution method was used for the comparison. **Results** The basic agreement rate for the detection of MIC of Escherichia coli to cefotaxime by the micro - broth dilution method and the DOT - MGA method was 96%, the classification agreement rate was 94%, the larger deviation was 2%, the minor deviation was 4%, and no major deviation was found, which were all within the clinically acceptable range. **Conclusion** MALDI - TOF MS Combined with DOT - MGA can accurately provide the drug sensitivity information of Escherichia coli to the third generation cephalosporins in a short time, and provide evidence for the accurate management of patients with bloodstream infection in the early stage of clinical practice.

**Key words** Direct - on - target microdroplet growth method; Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry; Blood stream infection; Third generation cephalosporin; Minimum inhibitory concentration

大肠杆菌是引起血流感染 (blood stream infection, BSI) 排名首位病原菌, 第 3 代头孢菌素具有抗菌谱广, 杀菌能力强、毒性不良反应小及临床疗效好等优点, 在临床广泛应用<sup>[1,2]</sup>。据报道, 第 3 代头孢菌素耐药大肠杆菌引起血流感染导致患者住院时间延

长, 医疗费用增加, 病死率可高达 16%<sup>[3]</sup>。及时准确获得药物敏感度信息尤其是最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 有助于临床精准抗感染治疗和改善患者预后。

目前, 传统药物敏感试验主要基于纸片扩散法和稀释法 (仪器法), 但上述方法存在操作繁琐且需要 16 ~ 18h 才能获得结果等缺陷<sup>[4]</sup>。先前有研究者应用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (matrix - as-

基金项目: 广东省医学科研基金资助项目 (B2021428)

作者单位: 528200 佛山, 华南理工大学附属第六医院检验科

通信作者: 蔡甜, 电子信箱: liuchunalone@163.com

sisted laser desorption ionization - time of flight, MALDI - TOF MS) 直接靶板微滴生长法 (direct - on - target microdroplet growth assay, DOT - MGA) 能够短时间内 (约 4h) 准确区分抗生素是否耐药, 但不能提供药物的具体 MIC 值<sup>[5,6]</sup>。本研究直接靶板微滴生长法快速检测血流感染大肠杆菌对第 3 代头孢菌素药敏试验拟进一步增加检测孔位 (代表对应 MIC 值), 提供大肠杆菌对第 3 代头孢菌素的药敏信息, 为临床精准治疗大肠杆菌血流感染提供实验数据, 现报告如下。

### 对象与方法

1. 实验菌株: 收集华南理工大学附属第六医院 2020 年 1 月 ~ 2022 年 1 月经临床科室诊断为非重复血流感染大肠杆菌, 50 株作为实验菌株, 病例资料包括男性 30 例, 女性 20 例, 患者平均年龄为  $55.04 \pm 19.34$  岁; 基础疾病以泌尿系统疾病占 62.5%、糖尿病占 50%、恶性肿瘤占 20% 为主; 标本来源科室有泌尿外科 13 株、普通外科 6 株、ICU 10 株、肿瘤血液科 8 株、感染科 4 株、内分泌内科 4 株、其他科 5 株。血流感染诊断标准参照 2001 年卫生部颁布的《医院感染诊断标准》: 至少 1 瓶血培养阳性且具备以下两项或两项以上体征: ①体温  $> 38^{\circ}\text{C}$  或  $< 36^{\circ}\text{C}$ ; ②心率  $> 90$  次/分; ③呼吸频率  $> 20$  次/分 或 动脉二氧化碳分压 (partial pressure of carbon dioxide in artery,  $\text{PaCO}_2$ )  $< 32\text{mmHg}$  ( $1\text{mmHg} = 0.133\text{kPa}$ ); ④外周血白细胞计数  $> 12.0 \times 10^9/\text{L}$  或  $< 4.0 \times 10^9/\text{L}$ , 或未成熟粒细胞  $> 0.10$ 。本研究经笔者医院医学伦理学委员会审批 (伦理学审批号: 2020158), 并豁免知情同意书签署。

2. 细菌鉴定及药敏试验: 细菌鉴定采用 MALDI - TOF MS, 药敏试验采用革兰阴性复合板 NMIC/ID (仪器为 BD PHOENIX 100 全自动细菌鉴定药敏系统), 药敏判断标准依据 CLSI M - 100 S29, 质控菌株为大肠杆菌 ATCC25922 购自广东省卫生健康委员会临床检验中心。

3. 微量肉汤稀释法: 按照 CLSI M07 - A11 文件标准: (1) 抗菌药物制备: 本实验选取第 3 代头孢菌素代表性药物头孢噻肟。制备头孢噻肟贮备液的浓度为  $5120\mu\text{g}/\text{ml}$ , 将头孢噻肟贮备液贮存于  $-60^{\circ}\text{C}$ , 保存期不超过 6 个月。(2) 待测菌制备: 用接种环挑取  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$  过夜培养的血琼脂平板纯菌落于 0.9% 氯化钠溶液中, 配制 0.5 麦氏浊度菌悬液, 并用 CAMHB 肉汤进行 1:100 稀释, 即得到约含菌数  $1 \times 10^6\text{CFU}/\text{ml}$  的菌液。(3) 将头孢噻肟贮备液倍比稀释成范围

为  $0.03 \sim 512\mu\text{g}/\text{ml}$  抗菌溶液, 分别取  $30\mu\text{l}$  不同浓度的头孢噻肟 +  $30\mu\text{l}$  待测菌液 (终菌量为  $5 \times 10^5\text{CFU}/\text{ml}$ ), 共  $60\mu\text{l}$  混匀加入 96 微孔板, 放置  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 16 ~ 20h 观察菌液生长情况, 同时用大肠杆菌 ATCC25922 作为对照, 判读标准参照 CLSI 相关文件。

4. 直接靶板微滴生长法: 参照 Idelevich 等<sup>[5]</sup>报道的方法, 用新鲜纯菌落配制 0.5 麦氏浊度菌悬液, 与 CAMHB 肉汤 1:100 稀释, 使菌液浓度为  $1 \times 10^6\text{CFU}/\text{ml}$ 。将  $3\mu\text{l}$  菌液和  $3\mu\text{l}$  头孢噻肟药物溶液 ( $0.03 \sim 512.00\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 混合于 MALDI - TOF MS 靶板 96 孔内作为检测孔, 形成终体积为  $6\mu\text{l}$  的微滴 (终菌量  $5 \times 10^5\text{CFU}/\text{ml}$ ), 同时用  $3\mu\text{l}$  菌液和  $3\mu\text{l}$  不加抗菌药物的 CAMHB 肉汤混合作为生长对照孔。为防止微滴在孵育过程中挥发, 需将靶板置于湿盒中,  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$  孵育 4h。

5. MALDI - TOF MS 质谱鉴定: 取出孵育完成的靶板, 用吸样枪每孔吸  $5\mu\text{l}$  液体弃去, 之后将靶板置于生物安全柜晾干, 加入  $1\mu\text{l}$  HCCA 基质液覆盖在样本上, 室温晾干。将 MALDI 靶板放入质谱仪检测, 获得细菌蛋白质谱, 用 MALDI Biotyper Software3.1 软件分析, 以上操作流程严格按照质谱仪要求方法。

6. 直接靶板微滴生长法判读标准: 每次平行试验, DOT - MGA 方法的生长对照孔 MALDI - TOF MS 鉴定得分  $\geq 1.7$  视为结果有效。在此基础上, 当待测菌株 MALDI - TOF MS 鉴定得分  $\geq 1.7$ , 提示细菌在该浓度的抗菌药物环境中生长, 视为耐药。若鉴定得分  $< 1.7$ , 提示细菌在该浓度的抗菌药物环境中不生长, 视为敏感。上述所对应的检测孔位即是待测菌具体 MIC 值。

7. 主要仪器和试剂: 头孢噻肟抗生素粉末购自上海生工生物工程股份有限公司 (货号: A601276)。CAMHB 肉汤购自杭州滨和微生物试剂有限公司 (货号: B162)。Corning<sup>®</sup> 96 孔 CellBIND<sup>®</sup> 微孔板购自美国 Sigmia - Aldrich 公司。MALDI - TOF MS 质谱仪、70% 甲酸溶液、80% 三氟乙酸溶液、HCCA 基质液、标靶等购自美国布鲁克道尔顿公司。

8. 统计学方法: 数据处理采用 Medcal20.0 软件, 以微量肉汤稀释法作为参比方法, 计算各类指标参照文献<sup>[7]</sup>: 基本一致率 (essential agreement, EA), 分类一致率 (categorical agreement, CA), 重大偏差 (very major discrepancy, VMD), 较大偏差 (major discrepancy, MD), 次要偏差 (minor discrepancy, mD), 当  $\text{EA} >$

90%、CA > 90%、VMD < 1.5%、MD < 3%、mD < 10% 时则认为测试方法药物过敏试验结果可接受。

## 结 果

1. 实验菌株对常用抗生素的敏感度:药敏结果显示,50株大肠杆菌对头孢类耐药率较高 > 30% 以上,而对含酶抑制剂、碳青霉烯类、阿米卡星保持高度敏感,耐药率均 < 10%,详见表 1。

表 1 50 株大肠杆菌对常用抗生素敏感度 (%)

抗生素	耐药率	敏感度
氨苄西林	83.2	16.8
头孢唑啉	60.9	39.1
头孢呋辛	59.1	40.9
头孢噻肟	46.3	50.3
头孢他啶	32.5	65.5
头孢吡肟	28.3	63.9
氨曲南	31.2	61.0
哌拉西林/他唑巴坦	6.8	91.3
亚胺培南	0.4	99.2
美罗培南	0.4	99.2
阿米卡星	0.8	98.1
庆大霉素	28.8	70.4
环丙沙星	45.6	52.4
复方新诺明	54.3	45.3

2. 微量肉汤稀释法和 DOT - MGA 法的重复性和稳定性:本研究采用大肠杆菌 ATCC25922 (MIC 为 0.03 ~ 0.125  $\mu\text{g/ml}$ ),在连续 10 天重复对比试验中,微量肉汤稀释法和 DOT - MGA 法基本一致率为 100%,分类一致率为 100%,详见表 2。

表 2 微量肉汤稀释法和 DOT - MGA 法检测 ATCC25922 的 MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )

时间	微量肉汤稀释法	DOT - MGA 法
第 1 天	0.060	0.060
第 2 天	0.125	0.125
第 3 天	0.125	0.125
第 4 天	0.060	0.125
第 5 天	0.060	0.060
第 6 天	0.125	0.125
第 7 天	0.060	0.060
第 8 天	0.060	0.060
第 9 天	0.125	0.125
第 10 天	0.060	0.060

3. 微量肉汤稀释法和 DOT - MGA 法检测结果比较:采用 DOT - MGA 法检测 50 株大肠杆菌的 MIC 值,与微量肉汤稀释法比较,总体 EA 为 96%,CA 为

94%,VMD、MD 和 mD 分别为 0、2% 和 4%,详见表 3。

表 3 两种方法检测实验菌株比较

MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	株数	EA (%)	CA (%)	VMD (n)	MD (n)	mD (n)
0.125	3	100	100	0	0	0
0.25	6	100	100	0	0	0
0.5	11	100	100	0	0	0
1	4	75	75	0	1	0
2	2	50	0	0	0	2
8	4	100	100	0	0	0
16	5	100	100	0	0	0
32	6	100	100	0	0	0
64	5	100	100	0	0	0
128	3	100	100	0	0	0
> 256	1	100	100	0	0	0
合计	50	96	94	0	1	2

## 讨 论

快速准确提供血流感染大肠杆菌药敏结果有助于临床精准用药和改善患者的预后。本研究结果显示,MALDI - TOF MS 技术 DOT - MGA 方法能够快速 (约 4h) 准确提供大肠杆菌对第 3 代头孢菌素的药敏信息。

MALDI - TOF MS 是一种检测微生物的新型工具,具有快速、准确、经济等优势,受到临床实验室的广泛关注<sup>[8]</sup>。据国内研究者报道,应用 MALDI - TOF MS 快速鉴定产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌、耐甲氧西林葡萄球菌、碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌等,且上述研究仅依据特定菌株质谱特征峰差异区分是否耐药株,但不能提供药敏试验的具体 MIC 值<sup>[9-11]</sup>。直接靶板微滴生长法是将不同浓度抗生素与待测菌孵育一段时间后,通过 MALDI - TOF MS 直接检测细菌,间接预测待测菌药物敏感度 (MIC 值)<sup>[12,13]</sup>。

本研究对 50 株大肠杆菌血流感染临床菌株进行分析,结果显示,两种方法检测大肠杆菌对头孢噻肟总体 EA 为 96%,CA 为 94%,在可接受误差范围之内。Idelevich 等<sup>[14]</sup>报道直接检测肠杆菌所致血流感染对美罗培南的敏感度,对样本前处理结合孵育 4h 后,区分待测菌株是否对美罗培南耐药的敏感度为 91.7%,特异性为 100.0%。沈佳瑾等<sup>[15]</sup>报道孵育时间 4h 或 5h,DOT - MGA 法能够准确地区分耐碳青霉烯类肠杆菌。Tang 等<sup>[16]</sup>对 44 株肠杆菌目细菌所致血流感染,检测 6 种抗生素耐药性,DOT - MGA 法检测头孢曲松耐药性与直接药敏法和微量肉汤稀释法分类一致率 100%。相比上述研究采用 CLSI 文件规

定的抗生素中介浓度作为检测孔位,本研究还能提供药物具体 MIC 值,这有助于临床依据药敏信息及时调整和优化治疗方案,更改或加大抗生素剂量、避免使用高级抗生素、降低细菌耐药产生。

本实验中仅有 1 株发生较大偏差(占 2%)和两株次要偏差(占 4%),未发生重大偏差,均在临床可接受误差范围之内。造成差异的原因可能与检测方法有关,微量肉汤稀释法影响因素较多,采用质谱技术相对客观,并且检测敏感度高于稀释法<sup>[17,18]</sup>。本研究也存在不足之处,一方面虽然本研究采用的检测孔位较多,可以向临床提供更多的信息,但是本研究纳入单一细菌,种类数量较少,对黏液型菌株检测能力如何仍不清楚;另一方面本研究仅检测头孢噻肟的敏感信息,今后将扩大对其他抗生素的实验,检测细菌耐药表型,为快速检测药物敏感信息提供数据支持<sup>[19,20]</sup>。

综上所述,基于 MALDI - TOF MS 结合 DOT - MGA 法能够短时间内准确提供大肠杆菌对第 3 代头孢菌素的敏感度,为临床早期管理血流感染患者提供依据。

#### 参考文献

- 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2020 年 CHINET 中国细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2021, 21(4): 377 - 387
- Coope C, Schneider A, Zhang T, *et al.* Identifying key influences on antibiotic use in China: a systematic scoping review and narrative synthesis[J]. *BMJ Open*, 2022, 12(3): e056348
- Yan M, Zheng B, Li Y, *et al.* Antimicrobial susceptibility trends among gram - negative bacilli causing bloodstream infections: results from the china antimicrobial resistance surveillance trial (CARST) program, 2011 - 2020[J]. *Infect Drug Resist*, 2022, 15: 2325 - 2337
- Doern CD. The slow march toward rapid phenotypic antimicrobial susceptibility testing: are we there yet? [J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(4): e01999 - 17
- Idelevich EA, Sparbier K, Kostrzewa M, *et al.* Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI - TOF mass spectrometry using a novel direct - on - target microdroplet growth assay [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2018, 24(7): 738 - 743
- Liu Z, Tang H, Xu H, *et al.* Rapid identification and drug sensitivity test to urinary tract infection pathogens by DOT - MGA [J]. *Infect Drug Resist*, 2022, 15: 1391 - 1397
- 赵婉彤, 潘芬, 姚剑杰, 等. 比较 Thermo STP6F 药敏测定卡与微量肉汤稀释法测定链球菌对抗菌药物的敏感度[J]. 中国感染

与化疗杂志, 2019, 19(4): 425 - 430

- Correa - Martínez CL, Idelevich EA, Sparbier K, *et al.* Development of a MALDI - TOF MS - based screening panel for accelerated differential detection of carbapenemases in Enterobacterales using the direct - on - target microdroplet growth assay [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 4988
- 梁世周, 许建平, 蔡文品, 等. MALDI - TOFMS 快速检测阳性血培养中肠杆菌目细菌碳青霉烯酶活性的评价[J]. 浙江医学, 2022, 44(16): 1731 - 1735, 1763
- 郭坤山, 王山梅, 马冰, 等. MALDI - TOF MS 在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌快速筛查中的价值[J]. 检验医学, 2021, 36(2): 209 - 212
- 汪华学, 张杰, 曹云松, 等. 应用 MALDI - TOF MS 快速鉴定 *bla*<sub>KPC-2</sub> 基因型肺炎克雷伯菌[J]. 中国感染控制杂志, 2022, 21(3): 217 - 223
- Kostrzewa M. Application of the MALDI Biotyper to clinical microbiology: progress and potential [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2018, 15(3): 193 - 202
- Idelevich EA, Becker K. Matrix - assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry for antimicrobial susceptibility testing [J]. *J Clin Microbiol*, 2021, 59(12): e0181419
- Idelevich EA, Storck LM, Sparbier K, *et al.* Rapid direct susceptibility testing from positive blood cultures by the matrix - assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry - based direct - on - target microdroplet growth assay [J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(10): e00913 - 18
- 沈佳瑾, 黄声雷, 周春妹, 等. MALDI - TOF. MS 直接靶板微滴生长法对耐碳青霉烯类肠杆菌的快速鉴别诊断价值[J]. 中国临床医学, 2020, 27(4): 549 - 553
- Tang H, Li R, Xu H, *et al.* Direct - on - target microdroplet growth assay for detection of bacterial resistance in positive blood cultures [J]. *Infect Drug Resist*, 2021, 14: 4611 - 4617
- Neonakis IK, Spandidos DA. MALDI - TOF MS - based direct - on - target microdroplet growth assay: latest developments [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(3): 2555 - 2556
- 张杰, 张金鑫, 楚新旭, 等. MALDI - TOFMS 在耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌同源性分析的应用研究[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(4): 381 - 387
- Li R, Tang H, Xu H, *et al.* Direct - on - target microdroplet growth assay applications for clinical antimicrobial susceptibility testing [J]. *Infect Drug Resist*, 2021, 14: 1423 - 1425
- Idelevich EA, Nix ID, Busch JA, *et al.* Rapid simultaneous testing of multiple antibiotics by the MALDI - TOF MS direct - on - target microdroplet growth assay [J]. *Diagnostics: Basel*, 2021, 11(10): 1803

(收稿日期: 2022 - 10 - 05)

(修回日期: 2022 - 11 - 02)