

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.33.020

## MALDI-TOF 质谱在院内感染致病菌检测中的应用\*

屠博文<sup>1</sup>, 史伟峰<sup>2</sup>, 韩晓冬<sup>3</sup>, 杜强<sup>1</sup>, 徐晓怡<sup>1</sup>, 郝超<sup>1△</sup>

(1. 江苏省常州市疾病预防控制中心 213000; 2. 江苏省常州市第一人民医院检验科 213000;  
3. 南京大学医学院, 南京 210093)

**[摘要]** **目的** 采用 MALDI-TOF 质谱分析方法鉴定院内感染致病菌。**方法** 同步使用 VITEK-2 和 MALDI-TOF 质谱鉴定院内感染致病菌。从检测时间、鉴定率及检出数量进行两种方法的对比。将微生物大分子指纹图谱进行共性峰比对计算, 获得院内感染致病菌株间同源性结构关系的差异。**结果** 共检出 31 株大肠埃希氏菌、28 株肺炎克雷伯氏菌及解鸟苷酸拉乌尔菌等罕见致病菌 9 株。MALDI-TOF 质谱检测能够在 1 h 内检出所有的致病菌, 且鉴定率和检出数量高于 VITEK-2。**结论** 致病菌的院内感染呈现科室为中心点源传播的模式。MALDI-TOF 质谱检测速度快、准确率高, 能够进行临床耐药菌的聚类分析, 有望成为致病菌鉴定和临床耐药菌风险监测工作的主要技术力量。

**[关键词]** 交叉感染 MALDI-TOF 质谱; VITEK-2 生化分析; 同源性分析

**[中图分类号]** R115 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)33-4665-06

### The application of MALDI-TOF mass spectrometry in pathogen detection from the nosocomial infection\*

Tu Bowen<sup>1</sup>, Shi Weifeng<sup>2</sup>, Han Xiaodong<sup>3</sup>, Du Qiang<sup>1</sup>, Xu Xiaoyi<sup>1</sup>, Hao Chao<sup>1△</sup>

(1. Center for Disease Control and Prevention of Changzhou City, Changzhou, Jiangsu 213000, China;  
2. Department of Clinical Laboratory, First People's Hospital of Changzhou City, Changzhou, Jiangsu 213000, China;  
3. Medical School of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210093, China)

**[Abstract]** **Objective** Pathogens from the nosocomial infection have been analyzed by MALDI-TOF microbial identification system, to evaluate mass spectrometry analysis advantage and explore the mass spectrometry method. **Methods** The pathogens have been analyzed by MALDI-TOF microbial identification system, by compared with the VITEK-2 compact detection in the testing time, detection rate and the amounts of identified strains. The homology differences have been analyzed by comparison calculation of common peaks from the fingerprint spectrums. **Results** Thirty-one Escherichia coli strains, 28 Klebsiella pneumonia strains and 9 unusual pathogen strains have been identified by MALDI-TOF MS for only 1 hours. It has more advantages than VITEK-2 in the testing time and other aspects. **Conclusion** Nosocomial infection of pathogen shows a point source propagation mode centering on the department. MALDI-TOF mass spectrometry is able to rapidly and correctly identify the pathogen. MALDI-TOF microbial identification system is expected to be the major detecting technique in the field of the pathogen monitor and resistance monitoring analysis.

**[Key words]** cross infection MALDI-TOF mass spectrometry; VITEK-2 biochemical analysis; homology analysis

院内感染具有较高的发病率和较强的传染性, 逐渐成为一个全球性的问题, 微生物耐药的不断增强威胁着全球人类健康安全。抗菌药物滥用现象不断加剧, 细菌产生的耐药性日趋泛滥。产碳青霉烯酶是革兰阴性菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要原因<sup>[1]</sup>。随着新德里 β 内酰胺类 B 型碳青霉烯类耐药菌在印度新德里的一家医院被首次检出, 并逐渐在全球范围蔓延<sup>[2-4]</sup>, 耐药菌感染成为院内感染的主要致病因素。

耐药菌的早期诊断和疾病预防过程中, 快速高效的微生物鉴定成为挽救患者和控制疾病蔓延的关键。传统的微生物鉴定方法通常采用血平板培养和生化反应鉴定结合的方法, 目前该方法已经成为医院菌株鉴定的金标准技术。然而, 随着院内感染状况的不断加剧, 为了争取更多的治疗时间, 致病菌的快速鉴定已经成为临床和疾控工作迫在眉睫的技术要求。MALDI-TOF 质谱近年来开始在微生物鉴定中应用<sup>[5-6]</sup>, 该方

法只在微生物实验室中被运用, MALDI-TOF 质谱技术能够以稳定分子量的生物大分子为指纹图谱, 通过建立大量的目标菌株图谱数据库来实现快速鉴定菌株的目的, 具有高效、快捷和准确的特点。此外, 蛋白质指纹图谱还能用于分析菌株的亲缘关系, 但近年来菌株同源性的 MALDI-TOF 质谱分析鲜有文献报道<sup>[7]</sup>。本文首先将两种快速鉴定院内感染致病菌的方法进行比较, 并通过不同来源的同种耐药菌进行 MALDI-TOF 质谱图谱对比, 分析不同来源致病菌的 MALDI-TOF 质谱同源性, 以此辅助评估耐药致病菌的传播风险, 为建立临床突发院内感染的快速检测方法提供理论研究经验。

### 1 材料与方

#### 1.1 材料

**1.1.1 样品收集及分离纯化** 院内感染病例及污水样品取自某市第一及第二人民医院, 待检样品经过营养肉汤复苏及血平

\* 基金项目: 市级科技局基金项目(CJ201130012)。 作者简介: 屠博文(1984—), 助理研究员, 博士, 主要从事病原微生物质谱检测和院内感染超级细菌的基因分型研究。 △ 通讯作者: E-mail: 18906113216@189.cn。

板分离培养纯化获得待测菌株,制备成麦氏浊度 5.0 的菌悬液,其余由 MicroBank 细菌保存磁珠(Pro-Lab 公司)冻存于  $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱中。大肠杆菌标准菌株 ATCC8739 由法国梅里埃公司代购自美国菌株保藏中心。

**1.1.2 培养基** 营养肉汤干粉购自青岛海博生物技术有限公司,营养琼脂及血平板培养基平板购自科玛嘉生物技术有限公司。

**1.1.3 仪器与试剂** 主要仪器: MALDI-TOF 生物质谱仪(VITEK MS,梅里埃)、VITEK-2 生化分析仪(VITEK-2 Compact 30,梅里埃)、全自动革兰染色仪(PREVI Color Gram,梅里埃)、ISOLA 全自动平板涂布仪(PREVI ISOLA 29500,梅里埃)、恒温培养箱(GNP9050,精宏)、 $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱(DW-86L338,海尔)。主要试剂:甲酸(formic acid,FA)、乙腈(acetonitrile,ACN)、乙醇和三氟乙酸(trifluoroacetic acid,TFA),为色谱纯,购自 Sigma 公司; $\alpha$ -氰-4-羟基肉桂酸( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-cinnamic acid,CHCA)粉末购自法国梅里埃公司;CHCA 饱和液是由超纯水、乙醇和乙腈按体积比 1:1:1 配制而成。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 菌株培养与 VITEK-2 生化分析鉴定** 将样品菌株通过 ISOLA 全自动平板划线仪接种至普通大豆营养琼脂平板,  $37^{\circ}\text{C}$  培养 24 h。选取单一菌落通过全自动革兰染色仪进行革兰染色,选用合适的 GN 或 GP 芯片进行鉴定,每个样品设置 2 个平行组。

**1.2.2 MALDI-TOF 质谱鉴定** 参数调整:激光强度 62 Hz,每孔采样率 100 次,相对分子质量 2 000~20 000,有效检测 3 000~13 000,峰值调整模式为线性。质控校准:选取大肠杆菌 ATCC8739 作为质控菌,靶板点样 48 个样品进行分析后检出率达 99.90% 以上即为质控合格。本实验采用同一待测样品连续点样的方式进行分析,随机选取未知样品(编号: CZ14000267)和质控菌株 ATCC8739 大肠杆菌,分别进行点样。在不同靶板上点样质控菌株(2 组平行)和未知样品菌株(10 组平行),收集每次检出的结果及特征峰图谱叠加进行比对。样品制备:吸取 1.0  $\mu\text{L}$  的样品菌悬液(麦氏浊度 5.0),滴加于 MALDI-TOF 质谱细菌靶板对应孔,随后滴加 1  $\mu\text{L}$  甲酸乙醇溶液(甲酸:乙醇:水=1:1:1),充分混合菌斑后常温

静置 20 min。接着滴加 1.0  $\mu\text{L}$  的 CHCA 饱和液和基质液常温静置 10 min。待孔位结晶完整置于 MALDI-TOF 生物质谱仪进行分析。以 ATCC8739 大肠杆菌为鉴定质控菌为阳性对照孔。质谱分析:采用 RUO 系统软件对采集的样品图谱进行比对分析,与 Myla 指纹数据库中的对应标准菌株的超级图谱和参考图谱进行多重比对。以参考检出率表示为鉴定结果。超过 75.00% 的则为检出,75.00~79.90% 代表可信性较低,80.00~89.90% 代表有部分可信度,90.00~94.90% 代表有较高的可信度,95.00~99.90% 代表有极高的可信度;低于 75% 则代表未检出。

**1.2.3 VITEK-2 及 MALDI-TOF 质谱方法比较** 将院内感染患者样品分离获得的待测菌株,同时进行 VITEK-2 和 MALDI-TOF 质谱鉴定。以大肠杆菌 ATCC8739 为内参分别以检测时间、检出数量、检出率进行差异分析。

**1.2.4 致病菌 MALDI-TOF 质谱同源性分析** 选取样品检出率最高的平行组图谱进行聚类分析。通过 VITEK MS SARAMIS 软件对图谱进行共性峰计算及峰值统计,共性峰分析数量设置为 100~200,以树形图中距离远近表示同源性的差异。

## 2 结果

**2.1 VITEK-2 及 MALDI-TOF 质谱分析结果** VITEK-2 检出 27 株肺炎克雷伯氏菌和 28 株大肠埃希氏菌,有 4 株菌未检出。其中肺炎克雷伯氏菌的鉴定率为 85.00%~99.00%,大肠埃希氏菌的鉴定率则为 87.00%~99.00%。从培养单菌落获得菌悬液至检出共耗时 43 h(平板培养 24 h,生化鉴定 19 h)。MALDI-TOF 质谱鉴定检出 28 株肺炎克雷伯氏菌,鉴定率为 91.00%~99.90%;31 株大肠埃希氏菌,鉴定率为 94.60%~99.90%。从单菌落靶板制备至检出耗时 33 min(前处理及质控菌株校准需 25 min,所有菌株鉴定仅需 8 min),见表 1、2。环境样品中 VITEK-2 和 MALDI-TOF 还检出了 2 株解鸟苷酸拉乌尔菌,2 株粘质沙雷氏菌,2 株产气肠杆菌,2 株蜡样芽孢杆菌和 1 株凝结芽孢杆菌。VITEK-2 无法鉴别区分蜡样芽孢杆菌与苏云金芽孢杆菌,且所有样品的鉴定率低于 MALDI-TOF 质谱的结果,样品菌株 B07 和 B08 经过伴胞晶体染色为阴性,则鉴定为蜡样芽孢杆菌。该结果与质谱分析相同,见表 3。

表 1 肺炎克雷伯氏菌的 VITEK-2 和 MALDI-TOF 质谱检测结果

编号	样品号	VITEK-2		MALDI-TOF		来源科室	诊断
		结果	鉴定率(%)	结果	鉴定率(%)		
01	CZ13002941	肺炎克雷伯氏菌	87	肺炎克雷伯氏菌	91.55	ICU	冠心病(痰)
02	CZ13002876	肺炎克雷伯氏菌	91	肺炎克雷伯氏菌	93.20	ICU	冠心病(咽拭)
03	CZ13002879	肺炎克雷伯氏菌	88	肺炎克雷伯氏菌	92.60	ICU	急性肺炎
04	CZ13003439	肺炎克雷伯氏菌	93	肺炎克雷伯氏菌	99.90	ICU	右侧肺炎
05	CZ13003165	肺炎克雷伯氏菌	99	肺炎克雷伯氏菌	99.90	ICU	膀胱癌
06	CZ13002530	肺炎克雷伯氏菌	99	肺炎克雷伯氏菌	90.80	ICU	糖尿病
07	CZ20130071	肺炎克雷伯氏菌	98	肺炎克雷伯氏菌	91.00	ICU	支气管炎
08	CZ20130064	肺炎克雷伯氏菌	90	肺炎克雷伯氏菌	93.80	呼吸内科	肺炎
09	CZ13002416	肺炎克雷伯氏菌	85	肺炎克雷伯氏菌	99.90	呼吸内科	发热

续表 1 肺炎克雷伯氏菌的 VITEK-2 和 MALDI-TOF 质谱检测结果

编号	样品号	VITEK-2		MALDI-TOF		来源科室	诊断
		结果	鉴定率(%)	结果	鉴定率(%)		
10	CZ13001830	肺炎克雷伯氏菌	88	肺炎克雷伯氏菌	93.10	呼吸内科	肺炎
11	CZ20130682	肺炎克雷伯氏菌	90	肺炎克雷伯氏菌	99.90	呼吸内科	支气管炎(血)
12	CZ14000266	肺炎克雷伯氏菌	92	肺炎克雷伯氏菌	99.90	呼吸内科	肺炎
13	CZWA05061	肺炎克雷伯氏菌	92	肺炎克雷伯氏菌	90.20	呼吸内科	支气管炎(咽拭)
14	CZWA01021	肺炎克雷伯氏菌	90	肺炎克雷伯氏菌	90.80	血液科	粒细胞白血病
15	CZWA05011	肺炎克雷伯氏菌	95	肺炎克雷伯氏菌	91.20	ICU	肺水肿
16	CZWA01022	肺炎克雷伯氏菌	97	肺炎克雷伯氏菌	97.00	泌尿外科	尿路感染
17	CZWA01331	未检出	—	肺炎克雷伯氏菌	99.90	泌尿外科	肾盂肾炎
18	CZWA02061	肺炎克雷伯氏菌	99	肺炎克雷伯氏菌	92.50	泌尿外科	肾小球炎
19	CZWA06131	肺炎克雷伯氏菌	92	肺炎克雷伯氏菌	99.90	泌尿外科	尿毒症
20	CZWA06102	肺炎克雷伯氏菌	87	肺炎克雷伯氏菌	90.80	干部病房	帕金森
21	CZWA04043	肺炎克雷伯氏菌	95	肺炎克雷伯氏菌	93.70	干部病房	脑血栓
22	CZWA02062	肺炎克雷伯氏菌	98	肺炎克雷伯氏菌	99.90	免疫风湿科	发热红疹
23	CZWA02082	肺炎克雷伯氏菌	97	肺炎克雷伯氏菌	99.90	胃肠外科	胃溃疡
24	CZWA03061	肺炎克雷伯氏菌	92	肺炎克雷伯氏菌	95.00	胃肠外科	食管破裂
25	CZWA02033	肺炎克雷伯氏菌	95	肺炎克雷伯氏菌	94.60	ICU	胃癌(痰)
26	CZWA01042	肺炎克雷伯氏菌	99	肺炎克雷伯氏菌	96.10	ICU	胃癌(血)
27	CZWA06072	肺炎克雷伯氏菌	91	肺炎克雷伯氏菌	99.90	风湿免疫科	糖尿病
28	CZWA06033	肺炎克雷伯氏菌	88	肺炎克雷伯氏菌	90.50	口腔科	牙龈炎

—:此项无数据。

表 2 大肠埃希氏菌的 VITEK-2 和 MALDI-TOF 质谱检测结果

编号	样品号	VITEK-2		MALDI-TOF		来源科室	诊断
		结果	鉴定率(%)	结果	鉴定率(%)		
A01	CZ13002956	大肠埃希氏菌	88	大肠埃希氏菌	96.55	呼吸内科	肺部感染
A02	CZ13002957	未检出	—	大肠埃希氏菌	97.20	呼吸内科	肺部感染
A03	CZ13002959	大肠埃希氏菌	95	大肠埃希氏菌	95.60	风湿免疫科	发热
A04	CZ13002900	大肠埃希氏菌	92	大肠埃希氏菌	99.90	消化内科	肝癌
A05	CZ13002934	大肠埃希氏菌	99	大肠埃希氏菌	99.90	消化内科	胰腺癌
A06	CZ13002944	大肠埃希氏菌	99	大肠埃希氏菌	99.90	干部病房	帕金森
A07	CZ13002938	大肠埃希氏菌	91	大肠埃希氏菌	99.90	干部病房	胃癌
A08	CZ13002939	大肠埃希氏菌	94	大肠埃希氏菌	99.90	肝胆外科	胆囊炎
A09	CZ13002869	大肠埃希氏菌	93	大肠埃希氏菌	99.90	肝胆外科	肝炎
A10	CZ13002867	大肠埃希氏菌	94	大肠埃希氏菌	99.90	肝胆外科	梗阻性黄疸
A11	CZ13002875	大肠埃希氏菌	93	大肠埃希氏菌	99.90	肝胆外科	胆结石
A12	CZ13003440	大肠埃希氏菌	96	大肠埃希氏菌	99.90	肝胆外科	胆囊炎
A13	CZ20140496	大肠埃希氏菌	95	大肠埃希氏菌	99.90	肝胆外科	胆囊炎
A14	CZ14000270	大肠埃希氏菌	97	大肠埃希氏菌	99.90	干部病房 2	胃癌术后(咽拭)
A15	CZ14000264	大肠埃希氏菌	95	大肠埃希氏菌	99.90	干部病房 2	胃癌术后(血)
A16	CZ14000267	大肠埃希氏菌	89	大肠埃希氏菌	97.00	肾内科	尿路感染
A17	CZ14000269	大肠埃希氏菌	99	大肠埃希氏菌	99.90	肾内科	尿路感染(血)
A18	CZ14000229	大肠埃希氏菌	99	大肠埃希氏菌	99.90	肾内科	肾衰竭
A19	CZ14000218	大肠埃希氏菌	94	大肠埃希氏菌	99.90	肾内科	肾衰竭(血)

续表 2 大肠埃希氏菌的 VITEK-2 和 MALDI-TOF 质谱检测结果

编号	样品号	VITEK-2		MALDI-TOF		来源科室	诊断
		结果	鉴定率(%)	结果	鉴定率(%)		
A20	CZ14000220	未核出	—	大肠埃希氏菌	96.80	肾内科	肾盂肾炎
A21	CZ20140326	大肠埃希氏菌	95	大肠埃希氏菌	99.90	肾内科	肾盂肾炎(血)
A22	CZ14000195	大肠埃希氏菌	98	大肠埃希氏菌	99.90	免疫风湿科	发热红疹
A23	CZ20140314	大肠埃希氏菌	97	大肠埃希氏菌	99.90	内分泌科	糖尿病(血)
A24	CZ14000192	大肠埃希氏菌	95	大肠埃希氏菌	95.00	内分泌科	糖尿病(尿)
A25	CZ14000187	大肠埃希氏菌	87	大肠埃希氏菌	94.60	胃肠外科	急性阑尾炎
A26	CZWA04052	大肠埃希氏菌	90	大肠埃希氏菌	96.10	胃肠外科	肛周红肿
A27	CZWA01011	大肠埃希氏菌	91	大肠埃希氏菌	99.90	胃肠外科	不全性肠梗阻
A28	CZWA01023	大肠埃希氏菌	98	大肠埃希氏菌	90.50	胃肠外科	直肠癌
A29	CZWA06021	未核出	—	大肠埃希氏菌	99.90	特需病房	肝癌
A30	CZWA06061	大肠埃希氏菌	99	大肠埃希氏菌	99.90	泌尿外科	肾盂肾炎
A31	CZWA02033	大肠埃希氏菌	96	大肠埃希氏菌	99.90	泌尿外科	糖尿病

—:此项无数据。

表 3 其他菌株的 VITEK-2 和 MALDI-TOF 质谱检测结果

编号	样品号	VITEK-2		MALDI-TOF		来源科室	诊断
		结果	鉴定率(%)	结果	鉴定率(%)		
B01	CZST13050	解鸟苷酸拉乌尔菌	87	解鸟苷酸拉乌尔菌	91.55	急诊室	污水
B02	CZST13027	解鸟苷酸拉乌尔菌	90	解鸟苷酸拉乌尔菌	95.20	ICU	污水
B03	CZST13013	粘质沙雷氏菌	85	粘质沙雷氏菌	95.60	肝胆外科	污水
B04	CZST14003	粘质沙雷氏菌	90	粘质沙雷氏菌	99.90	肝胆外科	污水
B05	CZST13105	产气肠杆菌	99	产气肠杆菌	99.90	肝胆外科	污水
B06	CZST13088	产气肠杆菌	99	产气肠杆菌	99.90	ICU	污水
B07	CZST14014	蜡样芽孢杆菌/苏云金孢杆菌	50	蜡样芽孢杆菌	97.50	泌尿外科	污水
B08	CZST13073	蜡样芽孢杆菌/苏云金孢杆菌	50	蜡样芽孢杆菌	99.90	泌尿外科	污水
B09	CZST14023	凝结芽孢杆菌	75	凝结芽孢杆菌	90.10	泌尿外科	污水

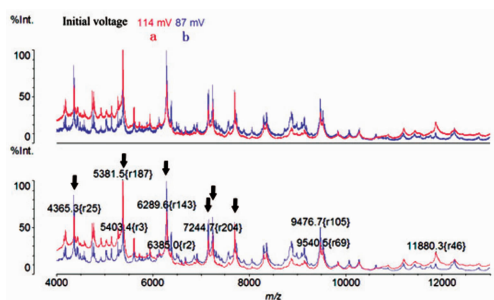


图 1 2 次质控菌株 ATCC8739 鉴定的特征峰图谱叠加图像

**2.2 MALDI-TOF 微生物鉴定的重复性与兼容性分析** 数据统计共获得 14 对主要的特征峰,图中黑色箭头表示的是其中明显的 6 个特征峰。与数据库中多个大肠埃希氏菌超级图谱(Myla 数据库超级图谱编号为:superspectrum *Escherichia coli* 38/0 DSM 10235 1/4/30/23/39/0 DSM 1576 1/31/10/18/20)比对,14 个特征峰完全吻合,见图 1。未知样品为大肠埃希氏菌,重复检测获得的 MALDI-TOF 图谱特征峰重叠,峰型完

整平滑,噪音峰少,信噪比高。较高峰值的特征峰几乎没有差异,且未见缺失及其他杂峰。由此可见,MALDI-TOF 微生物鉴定方法的重复性极好,检测结果可信度很高,见图 2。本鉴定方法通过检出峰与数据库中大量的超级图谱特征峰匹配率的分析,通过鉴定率百分比来确定检出结果的可信度,具有很高的兼容性。

**2.3 院内感染致病菌源性分析** 通过图谱特征峰及共性峰的统计归纳,经过计算获取不同来源的致病菌样品其亲缘关系,以此反映院内感染致病菌传播的潜在方向及风险。图 3 和 4 所示为不同来源的肺炎克雷伯氏菌图谱亲缘性分析结果。结合表 1 数据,大部分肺炎克雷伯氏菌的样品同源性很高,样品 1、2 和 25、26 为同一患者不同样品检出菌,结果显示其峰形一致,而大部分来自 ICU、呼吸内科等同科室院感样品菌株,其同源性都非常接近。而大肠埃希氏菌分析结果也有类似现象,其中 1 和 2、14 和 15、16 和 17、18 和 19、20 和 21 及 23 和 24 菌株来源于同一个患者,其图谱相同,属同源菌株。大部分亲缘性较近的菌株都来源于同一个科室。院内感染的发生和传播都以科室为中心呈现多点源传播的模式。



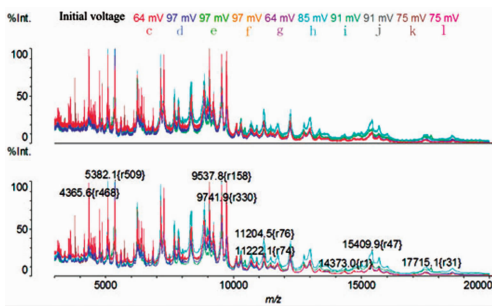


图 2 10 个平行组的未知菌株在不同初始电压下的叠加图谱

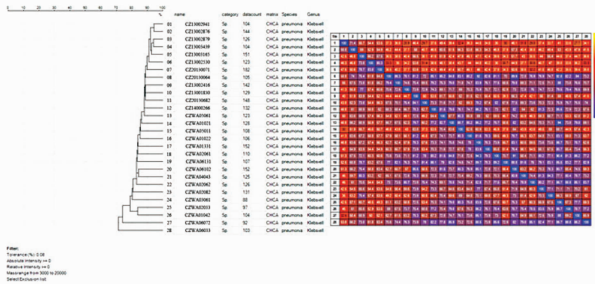


图 3 肺炎克雷伯氏菌检出特征峰的同源性分析

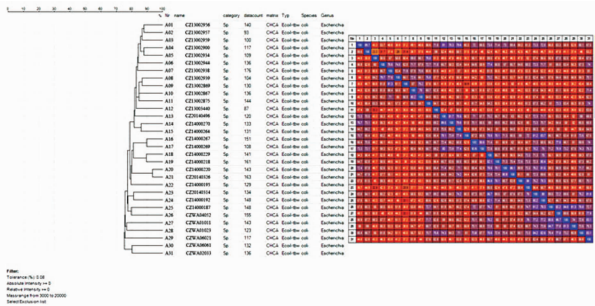


图 4 大肠埃希氏菌检出特征峰的同源性分析

### 3 讨论

传统的微生物鉴定方法通常以生化分析、菌落形态等表型鉴定,以及 PCR 和测序等分子鉴定为手段<sup>[8-9]</sup>,同步的还需进行致病菌毒力实验等辅助分析方法进行鉴定<sup>[10]</sup>。MALDI-TOF 主要以微生物内的核糖体蛋白、DNA 结合蛋白及冷休克蛋白等作为检测目标蛋白<sup>[11]</sup>,他们是管家基因编码的,相对稳定。由此 MALDI-TOF 质谱能检出一些生化反应不明显,抗原丢失及需要特殊染色辅助的致病菌。本文中 VITEK-2 未检出的 3 株大肠埃希氏菌,后续通过抗原修复和增菌,恢复了部分特征生化反应,经过再次分析仍只获得 87~90% 的鉴定率,且检测耗时 3 d,而 MALDI-TOF 质谱则展现出高效快速的特征在 1 h 内全部检出待测菌。本实验通过与基于生化鉴定方法为基础的 VITEK-2 同步鉴定对比,证明 MALDI-TOF 微生物鉴定系统无论在鉴定时间、准确率及鉴定率都具有显著的优势。

岛津公司田中耕一在 1988 年首次利用 MALDI-TOF 质谱鉴定生物大分子<sup>[12]</sup>。而同年 Karas 和 Hillenkamp 也成功利用 MALDI-TOF 技术建立了 10 000 的分子鉴定技术<sup>[13]</sup>。过去的 15 年,通用化的 MALDI-TOF 质谱才逐步成为一种研究生物大分子的有效分析工具<sup>[14]</sup>。MALDI-TOF 质谱的运行基本原理是样品在紫外吸收基质辅助下的光致电离散射。粒子

散射经过飞行时间质谱分析获得待测物质信息<sup>[15]</sup>。MALDI-TOF 运用于微生物鉴定则是基于基质处理后的细胞质蛋白质结晶的激光电离解析而建立的质谱分析技术,无论蛋白表达、细胞甚至组织学研究领域,MALDI-TOF 已经成为一种新型的检测生物大分子的研究方法<sup>[16-18]</sup>。然而,大部分的 MALDI-TOF 质谱分析都是基于实验室应用而言,很少直接运用于临床研究<sup>[9,16-19]</sup>。本文基于 RUO 分析系统及 Myla 微生物图谱数据库,尝试建立临床微生物快速分析的方法。为快速诊断急性和危重患者的院内感染及其他感染提供了理论基础。

此外,通过共性峰的同源分析,样品的亲缘关系还可以由质谱鉴定的方式展现出来,质谱分析获得的肽指纹谱能够通过峰值分析和计算获得样品的亲缘关系<sup>[7]</sup>。蛋白溯源法主要通过一些保守而稳定高表达的核糖体蛋白及 DNA 结合蛋白为标签进行的,在快速检出致病菌的同时,还能通过聚类分析得出致病菌株的亲缘关系,为及时有效的判断院内感染提供了帮助。但是,每一种微生物都具有各自特征性的表达蛋白,完善特征蛋白的质谱特征峰的数据可能使得蛋白溯源的准确性大大提高。完善的微生物鉴定质谱系统的建立对于耐药监控和高致病性致病菌的检测工作至关重要,MALDI-TOF 质谱在临床诊断运用有利于耐药监管工作及积极地预防突发公共卫生事件的发生。

### 参考文献

- [1] Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae [J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(10): 1791-1798.
- [2] Bonomo RA. New Delhi metallo-beta-lactamase and multi-drug resistance; a global SOS [J]. Clin Infect Dis, 2011, 52(5): 485-487.
- [3] Moellering RC. NDM-1-a cause for worldwide concern [J]. N Eng J med, 2010, 363(30): 2377-2379.
- [4] Rolain JM, Parola P, Cornaglia G. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic [J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(20): 1699-1701.
- [5] Salah Z, Gülay G, Stina B, et al. Identification of clinical Pasteurella isolates by MALDI-TOF-a comparison with VITEK 2 and conventional microbiological methods [J]. Diag Microbiol Infect Dis, 2013, 77(1): 96-98.
- [6] Haag AM, Taylor SN, Johnston KH, et al. Rapid identification and speciation of Haemophilus bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. J Mass Spect, 1998, 33(8): 750-756.
- [7] Prasanna D, Mark A. Mass Spectrometry in the Clinical Microbiology Laboratory, Part II: MALDI-TOF MS [J]. Clin Microbiol Newsl, 2012, 34: 18.
- [8] Hauser D, Popoff MR, Kiredjian M, et al. Polymerase chain reaction assay for diagnosis of potentially toxinogenic Coryne bacterium diphtheriae strains; correlation with ADP ribosylation activity assay [J]. J Clin Microbiol, 1993, 31(10): 2720-2723.
- [9] Schuegger R, Lindermayer M, Kugler R, et al. Detection

of toxigenic *Corynebacterium diphtheria* and *Corynebacterium ulcerans* strains by a novel real-time PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(8):2822-2823.

- [10] Engler KH, Glushkevich T, Mazurova IK, et al. A modified Elek test for detection of toxigenic corynebacteria in the diagnostic laboratory[J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(2):495-498.
- [11] Liu P, Li P, Jiang X, et al. Complete genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286, a multidrug resistant strain isolated from human sputum[J]. *J Bacteriol*, 2012, 194(7):1841-1842.
- [12] Tanaka K, Waki H, Ido Y, et al. Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1988, 2(8):151-153.
- [13] Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons[J]. *Anal Chem*, 1988, 60(30):2299-2301.
- [14] Stults JT. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. *Curr Opin Structu Biol*, 1995, 5(7):691-698.

- [15] Zenobi R, Knochenmuss R. Ion formation in MALDI mass spectrometry[J]. *Mass Spectr Rev*, 1998, 17(4):337-366.
- [16] Van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. 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*, 2010, 48(3):900-907.
- [17] Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Clin Infect Dis*, 2009, 49(4):543-551.
- [18] Sauer S, Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria[J]. *Nature Rev Microbiol*, 2010, 8(1):74-82.
- [19] Mellmann A, Cloud J, Maier T, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(6):1946-1954.

(收稿日期:2015-07-08 修回日期:2015-08-11)

(上接第 4664 页)

着手:术前、术中、术后合理使用抗菌药物;选择合适的剖宫产术式,以子宫下端剖宫为宜;术中避免拉断损伤腹肌;缝合脏壁层腹膜,恢复解剖层次,减少损伤,止血彻底,腹腔不留积血。(3)针对急诊手术,应加强手术医生业务素质的培训,提高缝合技巧和熟练程度,尽量缩短手术时间。加强手术室管理,按规定进行手术室空气、物体表面、手术器械、手术人员手的监测,规范手术部位的皮肤消毒,注重术后手术部位的护理。(4)缩短手术时间是降低切口感染的重要措施。进行术前访视,做好沟通,减少术中因患者不合作导致手术时间延长;做好术前物品准备,术前仔细检查物品包装、型号、灭菌效期、器械性能等,避免术中物品不齐而延长手术时间;建立手术医生个人手术习惯档案,提高手术的默契,根据手术医生个人习惯,可增配特殊器械,方便医生快速顺利完成手术;做好相关科室人员的调配工作,例如有需送标本行冰冻切片检查、输血、急会诊等情况,巡回护士能及时通知,相关科室及时执行到位,提高工作效率,避免因等待延长手术时间。(5)术前控制糖尿病、高血压等基础疾病,积极治疗妊娠期合并症,改善全身状态,增强身体免疫力。术后护理、换药等操作遵守无菌原则,密切观察体温变化,监测血糖、营养支持,减少感染机会。(6)预防胎膜早破,降低剖宫产手术后切口感染率,通过以下方法:要保持外阴清洁,孕前积极治疗生殖道炎症反应;孕期多吃蔬菜、水果,补充微量元素,均衡营养;避免孕晚期重体力劳动,防止过度疲劳,禁止性生活;重视产前检查,及时纠正胎位。(7)尽量减少不必要的阴道检查和肛门检查是降低感染发生率的重要措施。加强无菌操作观念,严格对外阴及会阴部进行消毒。(8)加强术后观察,密切注意子宫收缩,阴道流血情况和膀胱充盈度,防止产后大

出血。同时加强切口护理,保持切口清洁干燥,及时更换敷料。(9)严格掌握剖宫产指征,降低剖宫产率,从根本上减少切口感染的发生。

#### 参考文献

- [1] Gong SP, Guo HX. Morbidity and risk factors for surgical site infection following cesarean section in Guangdong Province China[J]. *J Obstet Gynaecol*, 2012, 38(3):509-515.
- [2] 段丽芳,张振英,孟庆娟,等. 医院感染管理持续质量改进对剖宫产术后感染的影响[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(16):2360-2361.
- [3] 陈敦金,何玉甜. 剖宫产子宫切口感染的防治[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2012, 28(6):414.
- [4] 梁琼,苏美如. 剖宫产患者目标性监测与分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2010, 20(15):2233-2234.
- [5] 韩一栩,刘玉珠. 瘢痕子宫二次妊娠剖宫产术后并发症发生情况分析[J]. *中国妇幼保健*, 2014, 29(20):3246-3248.
- [6] 南玲,刘丁,黄庆宁,等. 干预策略在剖宫产手术部位感染监测中的效果分析[J]. *实用预防医学*, 2013, 20(5):607-608.
- [7] 闫莉. 剖宫产后感染的危险因素分析及护理体会[J]. *吉林医学*, 2015, 36(15):3432-3433.
- [8] 乐杰. 妇产科学[M]. 7版. 北京:人民卫生出版社, 2008:137.

(收稿日期:2015-06-08 修回日期:2015-08-22)