

# 基于MALDI-TOFMS定量快速药敏试验在肺炎克雷伯菌对亚胺培南和替加环素药敏试验中的适用性分析

张龙桃<sup>1</sup>, 张安然<sup>2</sup>, 陈倩倩<sup>1</sup>, 孔海芳<sup>1</sup>, 胡志东<sup>1</sup>

(1. 天津医科大学总医院医学检验科, 天津 300052; 2. 山东省青岛市妇女儿童医院病理科, 青岛 266034)

**摘要** 目的:探讨基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF MS)的定量快速药敏试验(rAST)在肺炎克雷伯菌(KP)对亚胺培南(IPM)和替加环素(TGC)药敏试验中的实用性分析。方法:选取天津医科大学总医院2018年1月至2021年6月120株临床非重复KP,应用微量肉汤稀释法(BMD)检测其对IPM和TGC的最低抑菌浓度(MIC)值。采用优化甲酸提取法提取KP菌体蛋白,进行基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法的快速药敏试验[(MALDI-TOF MS)-based rAST]检测IPM和TGC的MIC值,并评估最佳的菌液稀释度和孵育时间。采用Cohen's kappa统计来评估(MALDI-TOF MS)-based rAST法和标准参考BMD的一致性。结果:在不同的孵育时间,上述两种方法处理后的质谱均能成功鉴定KP( $P>0.05$ );但优化后的甲酸提取法简化了操作流程,并且在菌量较低情况下的成功鉴定率高于常规方案。稀释25倍即菌液含量为 $6\times 10^6$  CFU/mL、孵育时间分别为2 h和3 h条件下,(MALDI-TOF MS)-based rAST法测得IPM( $P<0.01$ )和TGC( $P<0.001$ )的MIC值效果最佳;此条件下,(MALDI-TOF MS)-based rAST与BMD测得的MIC值相当,分别为IPM 70.83% (85/120)、TGC 66.67% (40/60),基本一致性(EA)分别为98.33% (118/120)、98.33% (59/60)。结论:(MALDI-TOF MS)-based rAST缩短了报告时间,是一种可靠的快速定量药敏试验方法。

**关键词** 肺炎克雷伯菌;MALDI-TOF MS 质谱;快速药敏试验;亚胺培南;替加环素

中图分类号 R372

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)03-0232-07

## Applicability analysis of rapid antimicrobial susceptible testing based on MALDI-TOF MS technique in imipenem and tigecycline susceptibility test of *Klebsiella pneumoniae*

ZHANG Longtao<sup>1</sup>, ZHANG Anran<sup>2</sup>, CHEN Qianqian<sup>1</sup>, KONG Haifang<sup>1</sup>, HU Zhidong<sup>1</sup>

(1. Department of Medical Laboratory, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2. Department of Pathology, Women and Children's Hospital of Qingdao, Qingdao 266034, China)

**Abstract Objective:** To investigate the practicability of rapid antimicrobial susceptible testing (rAST) based on mass-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in the susceptibility test of *Klebsiella pneumoniae* (KP) to imipenem (IPM) and tigecycline (TGC). **Methods:** A total of 120 clinical non-repetitive KP strains from Tianjin Medical University General Hospital from January 2018 to June 2021 were selected, and the minimum inhibitory concentrations (MIC) of IPM and TGC were detected by broth microdilution (MIC). The optimal formic acid extraction method was used to extract the protein of KP. The MIC values of IPM and TGC were detected by rapid antimicrobial susceptible testing based on mass-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry [(MALDI-TOF MS)-based rAST], and the optimal dilution and incubation time of the bacterial solution were evaluated. Cohen's kappa statistics were used to evaluate the consistency of (MALDI-TOF MS)-based rAST method and standard reference BMD. **Results:** The mass spectrometry of the two methods could successfully identify KP after different incubation time, and the difference was not statistically significant ( $P>0.05$ ). However, the optimized formic acid extraction method simplified the operation process, and the successful identification rate of the optimized method was higher than that of the conventional scheme under the condition of low bacterial quantity. The MIC of IPM ( $P<0.01$ ) and TGC ( $P<0.001$ ) were best measured by (MALDI-TOF MS)-based rAST method at a dilution of 25 times, with a bacterial solution content was  $6\times 10^6$  CFU/mL, and the incubation time was 2 h and 3 h, respectively. Under this condition, the MIC measured by (MALDI-TOF MS)-based rAST and broth microdilution method were similar, IPM 70.83% (85/120), TGC 66.67% (40/60) and essential error (EA) 98.33% (118/120), 98.33% (59/60), respectively. **Conclusion:** (MALDI-TOF MS)-based rAST can shorten the reporting time of KP to IPM and TGC, and is a reliable and quantitatively rapid antimicrobial susceptible testing.

**Key words** *Klebsiella pneumoniae*; MALDI-TOF MS; rAST; IPM; TGC

近年来,随着碳青霉烯类抗生素的广泛应用,耐

作者简介 张龙桃(1988-),女,主管技师,硕士在读,研究方向:临床检验诊断学;通信作者:胡志东,E-mail: huzhidong27@163.com。

碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)的感染呈全球蔓延趋势,已成为全球共同面临的严峻挑战。2014—2019

年,全国检出的肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)的菌株数呈上升趋势,其中CRKP的检出率由6.4%增长至10.9%<sup>[1]</sup>。因此,快速确定CRKP的耐药性并及时、合理地使用抗生素是治疗CRKP感染的关键。常规的药敏试验,如欧洲抗菌药物敏感性测试委员会(European Committee on Susceptibility Testing, EUCAST)推荐的快速药敏实验法、临床实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)的纸片扩散法、E-test、微量肉汤稀释法(broth microdilution method, BMD)和VITEK-2 Compact全自动药敏系统均需要大量增殖的病原菌,才能达到检测水平,检测时间需要8~24 h或更长<sup>[2-3]</sup>。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(mass-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)结合了常规表型分析的普遍性和分子分析的快速性、准确性,具有简单、快速、经济及高分辨率等优点,是鉴定病原菌高通量的一线工具<sup>[4-5]</sup>,已被开发用于快速检测细菌的耐药性。目前针对KP的基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法的快速药敏试验[rapid antimicrobial susceptible testing based on matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)-based rAST]主要有3种方法:(1)鉴定与耐药性相关的特定蛋白的质谱峰<sup>[6-10]</sup>。(2)分析抗生素水解产物的质谱(mass spectrometry, MS)峰谱并进行监测<sup>[11-14]</sup>。(3)基于KP生长情况的表型快速药敏试验(rapid antimicrobial susceptible testing, rAST)<sup>[15-16]</sup>。EUCAST和CLSI推荐基于KP生长情况的表型rAST法<sup>[17]</sup>,该方法具有普遍性,不局限于特定细菌种类、特定抗生素和特定耐药机制。基于这一原理,近年来一些研究利用MALDI-TOF MS实现了定性<sup>[18-19]</sup>和半定量rAST<sup>[20]</sup>,但很少有研究进行定量检验。因此,本研究拟开发一种定量(MALDI-TOF MS)-based rAST法用于KP对亚胺培南(imipenem, IPM)和替加环素(tigecycline, TGC)的药敏试验鉴定,探究其与BMD测定的IPM和TGC最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值的一致性。

## 1 材料与方法

1.1 标本来源 随机选取天津医科大学总医院2018年1月至2021年6月120株临床非重复KP,其中CRKP和碳青霉烯类敏感的KP(carbapenem-sensitive *Klebsiella pneumoniae*, CSKP)各60株。

1.2 仪器与试剂 基质辅助激光解析时间飞行质谱仪(法国生物梅里埃公司),VITEK-2 Compact全自动微生物鉴定分析仪(法国生物梅里埃公司),

IPM(杭州默沙东医药有限公司),TGC(江苏豪森医药有限公司),水解酪蛋白肉汤(hydrolyzed casein broth, MH)(美国BD公司)。

1.3 质控菌株 大肠埃希菌 ATCC 8739、大肠埃希菌 ATCC 25922、KP ATCC 700603。

## 1.4 方法

1.4.1 优化甲酸提取法 本研究制定了优化后甲酸提取法,常规甲酸提取法和优化后甲酸提取法具体步骤见图1。

1.4.2 BMD测定各菌株对IPM和TGC的MIC值 将0.5麦氏浊度的菌悬液用MH稀释100倍(菌液浓度为 $1.5 \times 10^6$  CFU/mL)。配制浓度梯度由高到低的含药MH肉汤,IPM倍比稀释的浓度共13组,依次为512、256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125  $\mu\text{g/mL}$ ;TGC倍比稀释的浓度共11组,依次为64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5  $\mu\text{g/mL}$ 。将100  $\mu\text{L}$ 的稀释后菌液接种于各浓度梯度的含药MH中共孵育,以100  $\mu\text{L}$ 不含药MH肉汤和100  $\mu\text{L}$ 稀释后菌液共孵育为阳性对照,200  $\mu\text{L}$ 不含药MH肉汤作为阴性对照。在37℃孵育18~20 h后读取OD值。使用CLSI<sup>[21]</sup>公布的折点对KP的IPM进行判读,即 $S \leq 1 \text{ mg/L}$ 、 $I = 2 \text{ mg/L}$ 、 $R \geq 4 \text{ mg/L}$ ;TGC判定折点按照美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)和中国专家共识关于肠杆菌科<sup>[22]</sup>的标准,即 $S \leq 2 \text{ mg/L}$ 、 $I = 4 \text{ mg/L}$ 、 $S \geq 8 \text{ mg/L}$ 。

1.4.3 (MALDI-TOF MS)-based rAST法测定各菌株对IPM和TGC的MIC值 两种药物的含药浓度同BMD,IPM共13组、TGC共11组。IPM:将每个菌株的0.5麦氏浊度菌悬液稀释100倍,直接与等量100  $\mu\text{L}$ 的MH孵育。37℃孵育相应时间后,用优化的甲酸提取方法处理悬浮液,利用MALDI-TOF MS IVD通道对各样本进行质谱分析,采用Myla 3.2.0进行数据分析并对细菌生长水平进行量化。MS-MIC值被定义为在一系列倍比稀释的IPM浓度中当置信水平<90%或未被MALDI-TOF MS成功鉴定的最低IPM浓度。培养方案:25倍稀释短孵育2 h、50倍稀释短孵育3 h、100倍稀释短孵育4 h。TGC:培养方案包括25倍稀释短孵育2 h、3 h、50倍稀释短孵育4 h、100倍稀释短孵育5 h。在TGC MIC值测定全程避光。评价(MALDI-TOF MS)-based rAST法测得的MIC值和BMD法测得的MIC值一致性时,可接受范围<sup>[23]</sup>:基本一致性(essential error, EA)或分类一致性(categorical agreement, CA)  $\geq 90\%$ ,小误差(minor errors, mE)  $\leq 3\%$ ,大误差(major errors, ME)  $\leq 1.5\%$ ,ME+重大误差(very major error, VME)  $\leq 7\%$ 。

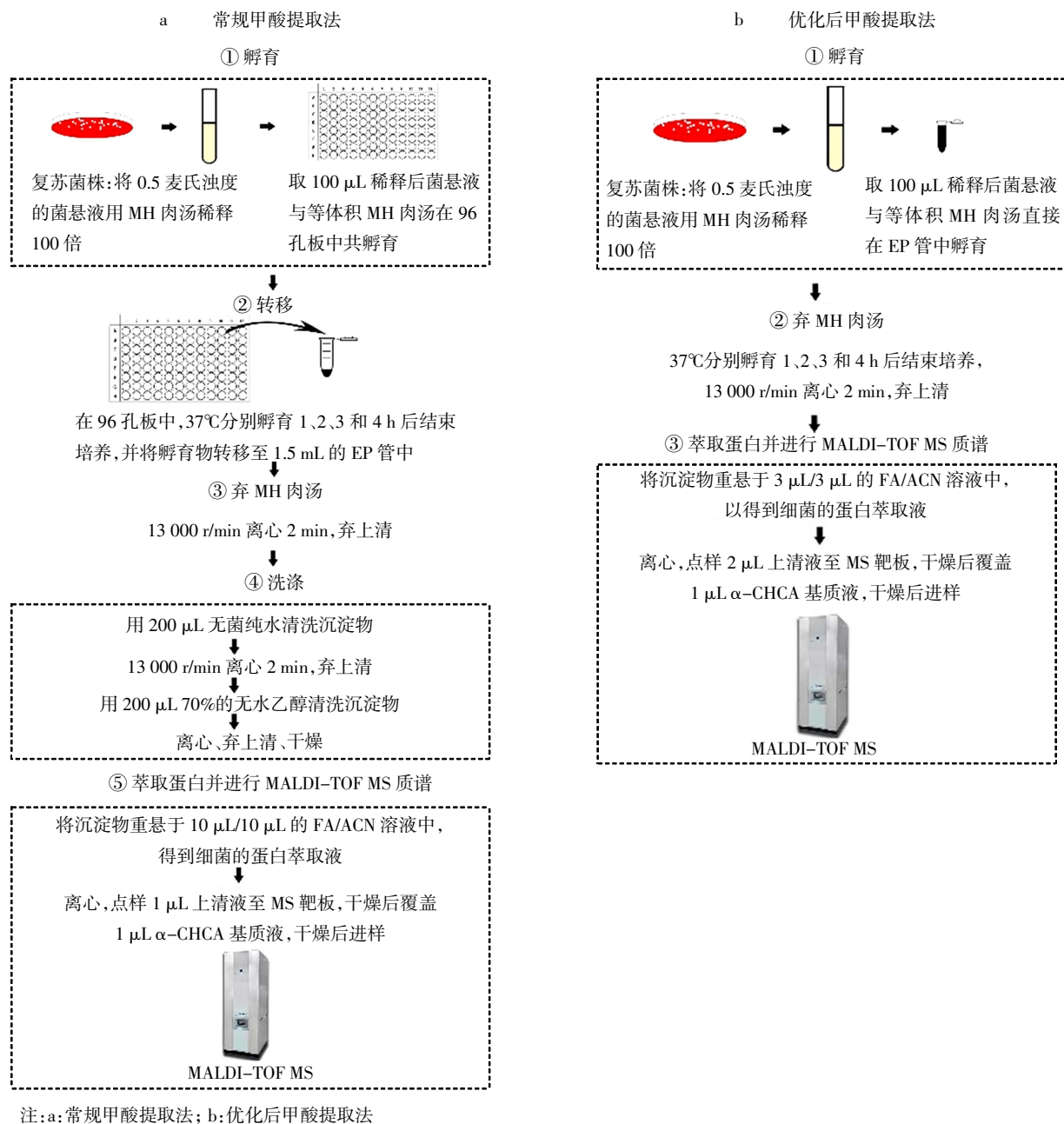


图 1 常规和优化后甲酸提取法操作流程示意图

Fig.1 Representative diagram of concrete operational processes of conventional and optimized formic acid extraction method

**1.5 统计学处理** 采用卡方检验和 Fisher 精确检验分析常规甲酸提取方法与优化后的甲酸提取法的差异。此外, 将 MALDI-TOF MS 的 MIC 值与 BMD 测定的 MIC 值进行比较, 采用 *Cohen's kappa* 统计来评估 (MALDI-TOF MS)-based rAST 的性能。*Kappa*<sup>[24]</sup> 值判定标准如下: 0.0~0.20 表示一致性极低、0.21~0.40 表示一致性一般、0.41~0.60 表示一致性中等、0.61~0.80 表示高度一致性、0.81~1 表示几乎完全一致。所有数据均采用 SPSS 23.0 进行统计分析。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 甲酸提取方法的优化 与常规方案相比, 优化

后甲酸提取法包括离心、蛋白质提取和鉴定, 用于 MALDI-TOF MS 分析, 只需约 15 min, 具有节省时间的优势 (常规方法需要每个样品约 25 min)。此外, 优化后的方法在敏感度 (表 1) 和蛋白质谱图 (图 2) 与常规方法比较没有显著差异, 两种方法均能成功鉴定 KP, 图中显示优化后的方法背景噪音高, 常规方法的细菌蛋白图谱质量较高, 在虚框内直接涂抹法和优化甲酸提取法的基线上扬, 常规方法的基线相对稳定。在细菌生物量较低的情况下, 优化后方法的成功鉴定率高于常规方案。使用该优化方案, 25 倍、50 倍和 100 倍稀释后, 在 2、3 和 4 h 的成功鉴定率均达到 100%。

表1 经常规与优化后甲酸提取法处理后MALDI-TOF MS成功鉴定率比较

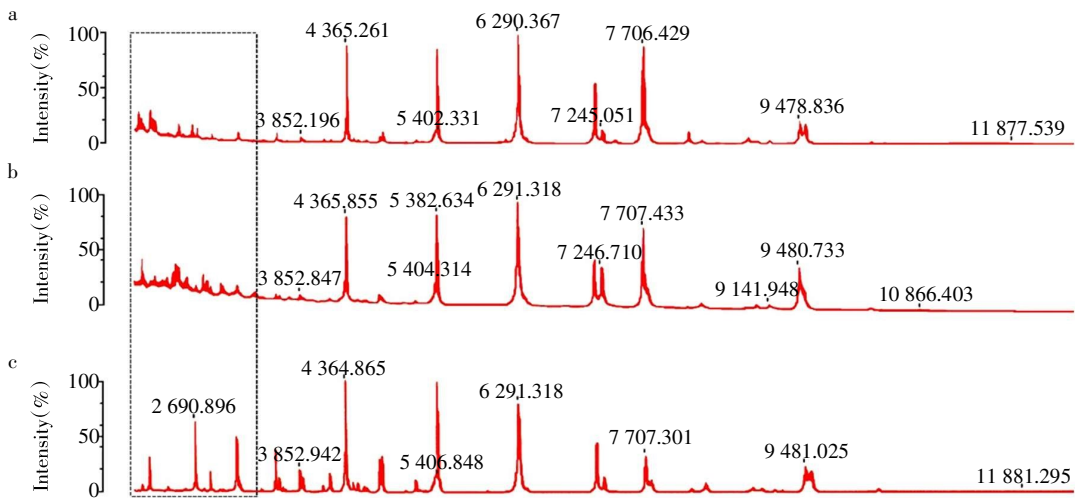
Tab.1 Comparison of successful identification rate of MALDI-TOF MS between the conventional and optimized formic acid extraction method

孵育时间	MALDI-TOF MS 成功鉴定率(%)		$\chi^2$	<i>P</i>
	优化方案	常规方案		
1 h	9.67(11/120)	5.00(6/120)	1.58	0.21
2 h	43.33(52/120)	39.17(47/120)	0.43	0.51
3 h	98.33(118/120)	93.33(118/120)	0.00	1.00
4 h	100.00(120/120)	100.00(120/120)	-	-

注:成功鉴定率定义为不同甲酸提取方法处理后,MALDI-TOF MS在生长对照中鉴定成功的百分比

2.2 BMD与(MALDI-TOF MS)-based rAST法测得IPM MIC值对比 BMD结果显示,IPM对120株KP的MIC范围为0.125~512 μg/mL。(MALDI-TOF MS)-based rAST法在稀释100倍孵育时间4 h的情况下,MS-MIC和BMD-MIC之间仅存在中度一致性,Kappa值为0.586(表2);25.00%(30/120)的MS-MIC值比对应的BMD-MIC值低一个浓度梯度,8.33%(10/120)的MS-MIC值比对应的BMD-MIC值低两个浓度梯度。

经验证,25倍稀释、孵育2 h在(MALDI-TOF MS)-based rAST效果最佳( $P<0.01$ ),70.83%(85/



注:a:直接涂抹法;b:优化甲酸提取法;c:常规甲酸洗涤法

图2 不同甲酸提取法的蛋白质谱图比较

Fig.2 Comparison of protein mass spectra of different formic acid extraction protocols

表2 (MALDI-TOF MS)-based rAST测定IPM MIC值的不同方案评价

Tab.2 Evaluation of different protocol for IPM and MIC determination by (MALDI-TOF MS)-based rAST

菌株	方案	MS-MIC与BMD-MIC结果一致性					一致率		错误发生率		
		MS-MIC=BMD-MIC	MS-MIC<BMD-MIC	MS-MIC>BMD-MIC	Cohen's kappa值	<i>P</i>	EA <sup>a</sup>	CA <sup>b</sup>	mE <sup>c</sup>	ME <sup>d</sup>	VME <sup>e</sup>
总计 ( <i>n</i> =120)	100倍,4 h	62.50% (75/120)	33.33% (40/120)	4.17% (5/120)	0.586±0.050	<0.01	91.67% (110/120)	92.50% (111/120)	0.083% (1/120)	0.00% (0/120)	0.083% (1/120)
	50倍,3 h	41.67% (50/120)	25.83% (31/120)	24.17% (39/120)	0.359±0.053	<0.01	95.00% (114/120)	82.50% (99/120)	5.83% (7/120)	1.67% (2/120)	0.00% (0/120)
	25倍,2 h	70.83% (85/120)	4.17% (5/120)	25.00% (30/120)	0.658±0.048	<0.01	98.33% (118/120)	95.83% (115/120)	2.50% (3/120)	1.67% (2/120)	0.00% (0/120)
CRKP ( <i>n</i> =60)	100倍,4 h	60.00% (36/60)	40.00% (24/60)	0.00% (0/60)	0.442±0.081	<0.01	90.00% (54/60)	98.33% (59/60)	0.00% (0/60)	-	1.67% (1/60)
	50倍,3 h	48.33% (29/60)	36.67% (22/60)	15.00% (9/60)	0.262±0.095	<0.01	98.33% (59/60)	98.33% (59/60)	1.67% (1/60)	-	0.00% (0/60)
	25倍,2 h	73.33% (44/60)	8.33% (5/60)	18.33% (11/60)	0.618±0.081	<0.01	100% (60/60)	100% (60/60)	0.00% (0/60)	-	0.00% (0/60)
CSKP ( <i>n</i> =60)	100倍,4 h	65.00% (39/60)	26.67% (16/60)	8.33% (5/60)	0.500±0.086	<0.01	93.33% (56/60)	86.67% (52/60)	1.67% (1/60)	0.00% (0/60)	-
	50倍,3 h	33.33% (21/60)	15.00% (9/60)	51.67% (30/60)	0.134±0.078	<0.01	91.67% (55/60)	66.67% (40/60)	10.00% (6/60)	3.33% (2/60)	-
	25倍,2 h	68.33% (41/60)	0.00% (0/60)	31.67% (19/60)	0.548±0.083	<0.01	96.67% (58/60)	91.67% (55/60)	5.00% (3/60)	3.33% (2/60)	-

注:CRKP:耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌;CSKP:碳青霉烯类敏感肺炎克雷伯菌;a:基本一致性(essential error,EA):用MALDI-TOF MS测定的MIC值在用BMD测定的MIC值的±1倍药物浓度范围内的百分比;b:分类一致性(categorical agreement,CA):MALDI-TOF MS药敏试验结果(S,I,R)与BMD分类一致的百分比;c:小误差(minor errors,mE):MALDI-TOF MS将中介判定为敏感或耐药,或将敏感或耐药判定为中介;d:大误差(major errors,ME):MALDI-TOF MS将敏感判定为耐药;e:重大误差(very major error,VME):MALDI-TOF MS将耐药判定为敏感

120)的 MS-MIC 值与相应的 BMD-MIC 值完全一样,显示出高度一致性( $Kappa=0.658$ ), $EA=98.33\%$  (118/120)、 $CA=95.83\%$  (115/120)。

2.3 BMD 与 (MALDI-TOF MS)-based rAST 法测得的 TGC MIC 值对比 BMD 结果显示,60 株临床 CRKP 菌株的 TGC MIC 范围为  $0.125\sim 8\mu\text{g/mL}$  ( $MIC_{50}=1\mu\text{g/mL}$ 、 $MIC_{90}=4\mu\text{g/mL}$ )。在 100 倍稀释、5 h 短期孵育的情况下,78.33% (47/60) 的 MS-MIC 值向较

低浓度梯度偏移。对于 (MALDI-TOF MS)-based rAST 的 TGC MIC 测定过程中,25 倍稀释在 3 h 的短期孵育时间内 MIC 值测定最准确 ( $P<0.001$ ,表 3),66.77% (40/60) 的菌株两种方法 MIC 检测值相当;该条件下,(MALDI-TOF MS)-based rAST 法的 MIC 值与 BMD 的一致性为 98.33% (59/60),出现 3 个小误差 (minor errors, mE),未发现大误差 (major errors, ME) 和重大误差 (very major error, VME)。

表 3 (MALDI-TOF MS)-based rAST 测定 TGC MIC 值的不同方案评价

Tab.3 Evaluation of different protocol for TGC and MIC determination by (MALDI-TOF MS)-based rAST

稀释倍数 孵育时间	1:100	1:50	1:25	
	5 h	4 h	2 h	3 h
MS-MIC 与 BMD-MIC 结果一致性				
MS-MIC=BMD-MIC	21.67% (13/60)	31.67% (19/60)	41.67% (25/60)	66.67% (40/60)
MS-MIC<BMD-MIC	78.33% (47/60)	66.67% (40/60)	55.00% (33/60)	28.33% (17/60)
MS-MIC>BMD-MIC	0.00% (0/60)	1.67% (1/60)	3.33% (2/60)	5.00% (3/60)
Cohen's kappa 值	0.027±0.059	0.169±0.074	0.262±0.076	0.562±0.078
P	0.626	0.002	<0.001	<0.001
一致率				
EA	73.33% (44/60)	83.33% (50/60)	91.67% (55/60)	98.33% (59/60)
CA	83.33% (50/60)	93.33% (56/60)	88.33% (53/60)	95.00% (57/60)
错误发生率				
mE	13.33% (8/60)	5.00% (3/60)	11.67% (7/60)	5.00% (3/60)
ME	4.08% (2/49) <sup>a</sup>	2.04% (1/49)	0.00% (0/49)	0.00% (0/49)
VME	0.00% (0/4) <sup>b</sup>	0.00% (0/4)	0.00% (0/4)	0.00% (0/4)

注:a: BMD 法鉴定为敏感的 49 株 CRKP 中有 2 株被 (MALDI-TOFMS)-based rAST 鉴定为耐药,ME 为 4.08%; b: 表示 BMD 法鉴定耐药的 4 株 CSKP 中没被 (MALDI-TOF MS)-based rAST 鉴定为耐药,VME 为 0.00%

### 3 讨论

在过去的二十年中,多重耐药革兰阴性菌引起的感染急剧增加,包括对碳青霉烯类和黏菌素等最后治疗手段耐药的细菌<sup>[25]</sup>,WHO 已将 KP 作为开发治疗医院感染的新型抗菌药物的首要目标<sup>[26]</sup>。CRKP 因其高耐药性和高致病性成为临床抗感染治疗的重大威胁,中国耐药监测中心发布的数据显示,近 10 年间 CRKP 检出率大幅度上升,截止到 2019 年天津地区 CRKP 的检出率高达 5.8% (1 173/20 225)<sup>[1]</sup>。本研究是首次在常规条件和现有参数设置下,利用 MALDI-TOF MS 技术对 KP 耐药性进行定量快速药敏试验的研究。探索 MALDI-TOF MS 测定 KP 对 IPM 和 TGC 的 MIC 值的最佳条件及其性能,可为 (MALDI-TOF MS)-based rAST 试验提供快速、可靠、有前景的方法学创新。

本研究首先对常规的甲酸提取法进行优化,短时培养条件下的关键步骤是不损失细菌细胞并去除 MH 肉汤<sup>[27]</sup>;同时,70%甲酸/100%乙腈 (FA/ACN) 的体积和 MS 靶板上清液的体积也影响 MALDI-

TOF MS 鉴定<sup>[28]</sup>。可能由于样本量较小导致两种方法在敏感度和蛋白质谱图上没有显著差异,但对于常规方案,将细菌转入 EP 管中并对沉淀菌体进行清洗,会造成不必要的细菌生物量损失,过量添加 FA/CAN 可能稀释蛋白浓度,降低鉴定灵敏度。本研究将稀释后的菌悬液直接孵育到 200  $\mu\text{L}$  的 EP 管中,省略了洗涤步骤,直接离心弃去上清液,采用 FA/ACN 和 VITEK MS 靶板上清液的最佳体积,明显缩短 MALDI-TOF MS 鉴定标本预处理的时间,并且不会对 MS-MIC 和 BMD-MIC 之间的一致性产生影响。

本研究发现,IPM 和 TGC 分别在 25 倍稀释、孵育 2 h 和 25 倍稀释、孵育 3 h 时,(MALDI-TOF MS)-based rAST 法测得的 MIC 值与 BMD 法测得的结果相等,提示该条件下 (MALDI-TOF MS)-based rAST 法测得 MIC 值可以用于临床 KP 快速药敏试验鉴定,与目前临床常规的药敏试验相比大大缩短了检测时间,能够快速、准确地实现 KP 快速药敏试验,对于临床启动或改变治疗至关重要。

根据 CLSI 建议,BMD 是所有表型药敏试验的

“金标准”<sup>[29]</sup>,然而,微生物从开始生长并对抗生素产生反应再到产生肉眼可见的药敏结果至少需要18 h,此外,以生长为基础的表型 rAST 的技术挑战还包括接种效应、耐药性延迟表达、滞后期<sup>[30]</sup>,即一些菌株在孵育的早期就表现出对抗生素敏感,导致 MS-MIC 值向较低的浓度梯度偏移,但只有延长孵育时间时才能观察到真正的耐药。在本研究中,首先采用和 BMD 相同的稀释倍数 100 倍进行短期孵育,在 100 倍稀释度且孵育时间较短的条件下,在 (MALDI-TOF MS)-based rAST 中有 33.33% 的 IPM 药敏试验和 78.33% 的 TGC 药敏试验明显受耐药延迟表达现象的影响。Wang 等<sup>[31]</sup>在 MALDI-TOF MS RUO 模式下使用 100 倍稀释度的菌悬液对 KP 进行快速药敏试验,其研究结果也表明 43.33% 的 CRKP 菌株和 13.33% 的 CSKP 菌株被耐药延迟表达现象显著影响。同时观察到耐药延迟表达现象在 TGC 药敏试验中更为明显,这可能是因为 IPM 和 TGC 的杀菌机制不同所致:TGC 通过与细菌核糖体 30S 亚单位结合,阻止氨酰-tRNA 进入核糖体 A 位进而抑制细菌蛋白质的合成起到杀菌作用<sup>[32]</sup>,使细菌蛋白生物量远远低于 MALDI-TOF MS 的最低检测限,而 IPM 通过抑制细胞壁黏肽合成酶,从而阻碍细胞壁黏肽合成,使细菌细胞壁缺损,菌体膨胀,致使细菌胞浆渗透压改变和细胞溶解而杀灭细菌<sup>[33]</sup>,对蛋白抑制能力较弱,以上情况表明应针对不同菌种和不同抗生素种类对实验条件进行调整。

Li 等<sup>[34]</sup>认为延长孵育时间或使用高浊度菌悬液是削弱耐药延迟表达现象的一种有效方法。在本研究中,相对于 BMD 将细菌浊度提高 4 倍(提高至 25 倍稀释度)不仅能有效缩短孵育时间至 2~3 h,还能显著降低耐药延迟表达现象对 KP 药敏试验引起的不一致性和误差。本研究采用 (MALDI-TOF MS)-based rAST 检测 KP 对 IPM 和 TGC 药敏试验鉴定,可通过收集指纹图谱与数据库比对进行细菌鉴定,该方法快速、简便且成本低、高通量、准确度高<sup>[35]</sup>,可为临床早期诊治提供更加及时准确的报告。

既往研究发现 MALDI Biotyper 抗生素药敏试验快速分析法 (MALDI Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay, MBT-ASTRA) 通过抗生素溶液制备、接种物制备、孵育、蛋白质提取、光谱采集及分析<sup>[36]</sup>等步骤,可在短时间内提供细菌耐药性的定性结果,同样,在本实验中所探究的 MALDI-TOF MS based-rAST 也可在当天将药敏结果快速报告给临床;并且两者均具有通量高、自动化能力高、适用范围广<sup>[37]</sup>等优点。但是 MBT-ASTRA 仅限于特定品

牌的 MALDI-TOF MS 设备,并且其 MBT-ASTRA 常用的软件需要编程专业知识及光谱分析能力,这对微生物实验室的专业人员提出了更高的技术要求,一般的微生物实验室通常难以达到该要求<sup>[38]</sup>。相较于 MBT-ASTRA,本实验中的 MALDI-TOF MS based-rAST 是基于 MALDI-TOF MS 设备最基础的质谱鉴定能力,不需要复杂的计算且不局限于特殊的品牌要求,步骤更具有简单性,可执行性更高,更适用于微生物实验室日常工作。

综上所述,体外表型药敏试验是目前微生物实验室向临床提供病原菌耐药性结果的主要方法,但其最大劣势在于报告时间较长,不能满足临床急诊诊疗的需求。本研究结果表明 MALDI-TOF MS 技术可在最佳方案下为 KP 提供普遍、快速和准确的药敏结果;随着微生物相关技术和临床数据库的发展, MALDI-TOF MS 在临床微生物应用中的适用性将进一步扩大,特别是 rAST 具有相当大的潜力,日后随着操作流程的完善和检测标准的优化, MALDI-TOF MS 技术无疑将大大推动病原菌药敏检测进程。

本研究也存在一定的局限性:缺乏中间耐药株,无法获得 IPM 完整的耐药谱,后续的研究中应扩大菌株的收集量,使研究更为全面;主要针对 IPM 和 TGC 进行研究。对于研究药物的种类应该根据临床医生的应用而进行拓展,为临床合理应用抗生素提供准确的理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 全国细菌耐药监测网 2014—2019 年耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌流行病学变迁[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(2): 175-179.
- [2] HUH H J, SONG D J, SHIM H J, et al. Performance evaluation of the QMAC-dRAST for staphylococci and enterococci isolated from blood culture: a comparative study of performance with the VITEK-2 system[J]. J Antimicrob Chemother, 2018, 73(5): 1267-1271.
- [3] BIN NAJEEB M A, GUPTA A, PURWAR S, et al. Implementing EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing method for sepsis: lessons learned in a tertiary care center[J]. J Infect Dev Ctries, 2021, 15(6): 833-839.
- [4] IDELEVICH E A, BECKER K. How to accelerate antimicrobial susceptibility testing[J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 25(11): 1347-1355.
- [5] HUSCHEK D, WITZEL K. Rapid dereplication of microbial isolates using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a mini-review[J]. J Adv Res, 2019, 19: 99-104.
- [6] LAU A F, WANG H, WEINGARTEN R A, et al. A rapid matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for single-plasmid tracking in an outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* [J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(8): 2804-2812.
- [7] LEE S, HWANG S, CHEON D H, et al. Clinical performance of the osmotic shock-MALDI MS method to detect *Klebsiella pneumoniae*



- carbapenemase in clinical isolates[J]. J Clin Microbiol, 2022, 60(11): e0106222.
- [8] CORDOVANA M, KOSTRZEWA M, GLANDORF J, et al. A full MALDI-based approach to detect plasmid-encoded KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. Front Microbiol, 2018, 9:2854.
- [9] 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.
- [10] BAO J, MA Y, DING M, et al. Preliminary exploration on the serum biomarkers of bloodstream infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* based on mass spectrometry[J]. J Clin Lab Anal, 2021, 35(9): e23915.
- [11] FLORIO W, BALDESCHI L, RIZZATO C, et al. Detection of antibiotic-resistance by MALDI-TOF mass spectrometry: an expanding area[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10:572909.
- [12] SAKARIKOU C, CIOTTI M, DOLFA C, et al. Rapid detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains derived from blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)[J]. BMC Microbiol, 2017, 17(1):54.
- [13] WILHELM C M, FORNI G R, CARNEIRO M D S, ET AL. Establishing a quantitative index of meropenem hydrolysis for the detection of KPC- and NDM-producing bacteria by MALDI-TOF MS[J]. J Microbiol Methods, 2021, 187: 106268.
- [14] LASSERRE C, DE SAINT MARTIN L, 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.
- [15] 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.
- [16] IDELEVICH E A, 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.
- [17] WEINSTEIN M P, LEWIS J S 2nd. The clinical and laboratory standards institute subcommittee on antimicrobial susceptibility testing: background, organization, functions, and processes[J]. J Clin Microbiol, 2020, 58(3): e01864-19.
- [18] HORSEMAN T S, LUSTIK M B, FONG K S K. Rapid qualitative antibiotic resistance characterization using VITEK MS[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2020, 97(4): 115093.
- [19] LI M, LIU M, SONG Q, et al. Rapid antimicrobial susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using a qualitative method in *Acinetobacter baumannii* complex[J]. J Microbiol Methods, 2018, 153: 60-65.
- [20] MAXSON T, TAYLOR-HOWELL C L, Minogue T D. Semi-quantitative MALDI-TOF for antimicrobial susceptibility testing in *Staphylococcus aureus*[J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0183899.
- [21] HUMPHRIES R M, KIRCHER S, FERRELL A, et al. The continued value of disk diffusion for assessing antimicrobial susceptibility in clinical laboratories: report from the clinical and laboratory standards institute methods development and standardization working group[J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(8): e00437-18.
- [22] 王辉, 俞云松, 王明贵, 等. 替加环素体外药敏试验操作规程专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(7): 584-587.
- [23] IDELEVICH E A, 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.
- [24] MCHUGH M L. Interrater reliability: the kappa statistic[J]. Biochem Med (Zagreb), 2012, 22(3): 276-282.
- [25] REYES J, AGUILAR A C, CAICEDO A. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: microbiology key points for clinical practice[J]. Int J Gen Med, 2019, 12: 437-446.
- [26] World Health Organization. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis[R]. WHO, 2017.
- [27] WELKER M, VAN BELKUM A. One system for all: is mass spectrometry a future alternative for conventional antibiotic susceptibility testing?[J]. Front Microbiol, 2019, 10:2711.
- [28] HUANG B, ZHANG L, ZHANG W, et al. Direct detection and identification of bacterial pathogens from urine with optimized specimen processing and enhanced testing algorithm [J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(5): 1488-1495.
- [29] ABBEY T C, DEAK E. What's new from the CLSI subcommittee on antimicrobial susceptibility testing M100[J]. Clin Microbiology Newsletter, 2019, 41(23): 203-209.
- [30] PEREZ-SAMPER G, CERULUS B, JARIANI A, et al. The Crabtree effect shapes the *Saccharomyces cerevisiae* lag phase during the switch between different carbon sources[J]. mBio, 2018, 9(5): e01331-18.
- [31] WANG G, SONG G, XU Y. A rapid antimicrobial susceptibility test for *Klebsiella pneumoniae* using a broth microdilution combined with MALDI TOF MS[J]. Infect Drug Resist, 2021, 14: 1823-1831.
- [32] 罗丹, 郝刚, 林思思, 等. 替加环素临床耐药性的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2015, 20(4): 466-468, 475.
- [33] 张莲卿, 何惠群, 陈丹等. 亚胺培南与美罗培南在临床应用中的对比分析[J]. 药学服务与研究, 2020, 20(4): 299-303.
- [34] LI M, LIU M, SONG Q, et al. Rapid antimicrobial susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using a qualitative method in *Acinetobacter baumannii* complex[J]. J Microbiol Methods, 2018, 153: 60-65.
- [35] IDELEVICH E A, BECKER K. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for antimicrobial susceptibility testing[J]. J Clin Microbiol, 2021, 59(12): e0181419.
- [36] GIBB S, STRIMMER K. MALDI quant: a versatile R package for the analysis of mass spectrometry data[J]. Bioinformatics, 2012, 28(17): 2270-2271.
- [37] SAUGET M, BERTRAND X, HOCQUET D. Rapid antibiotic susceptibility testing on blood cultures using MALDI-TOF MS[J]. PLoS One, 2018, 13(10): e0205603.
- [38] WILHELM C M, CARNEIRO M D S, INAMINE E, et al. A rapid and easy method of MALDI biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay to provide early meropenem susceptibility profile in *Enterobacteriales*[J]. Microbiol Spectr, 2023, 11(1): e0437522.