

• 临床研究 •

基于 MALDI-TOF MS 快速鉴定甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌及同源性分析

周陈浩, 鲍舟君, 陈琼娜, 李春儿

【摘要】目的 研究基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)在快速诊断甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌(MRSA)的使用价值和同源性。**方法** 选取 2023 年 7—12 月在舟山医院检验中心微生物实验室分离得到的 120 株金黄色葡萄球菌作为研究对象,分析 VITEK MS 质谱仪的应用价值。**结果** MRSA 44 株,占 36.7%;甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA) 76 株,占 63.3%。建立 ClinPro Tools 模型,与药敏试验比对,得出特征峰 1 灵敏度 71.4%,特异度 75.0%;特征峰 2 灵敏度 64.3%,特异度 72.2%,将两特征峰联合起来,灵敏度为 78.6%,特异度为 83.3%。44 株 MRSA 中 17 株 MS-I 型和模式 1 几乎接近,可以判断其同源性;MS-III 型 12 株和模式 3 也存在亲缘属性;MS-VI 型 5 株和模式 6 数量完全一致,菌株多重耐药,亲缘关系接近;其他型别和模式数量较少,无法判断其一致性。**结论** VITEK MS 质谱仪在 MRSA 和 MSSA 的快速鉴别中拥有良好的特异度和敏感度。通过 MALDI-TOF MS 聚类分析其同源性比较简便可行,同时对于在医院中流行的感染菌检测与追踪以及对耐药菌株的诊断也有着重大价值。

【关键词】 甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌;细菌耐药表型;同源性分析

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2025.06.006

【中图分类号】 R446.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2025)06-0569-04

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SAU)广泛存在于自然环境中,是比较常见的食源性致病菌,通过产生肠毒素引起食物中毒^[1-3]。SAU 作为医院与社区获得性感染的一种重要病原菌,表现出较强的致病力,能够引起多种严重感染,导致败血症、脓毒血症等全身性感染^[4-6]。此外,SAU 会引起软组织及皮肤感染,导致皮肤疖痈、坏疽、蜂窝组织炎及毛囊炎等^[7-9]。耐甲氧西林 SAU(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)和甲氧西林敏感性 SAU(methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*, MSSA)是 SAU 的两种不同类型。随着抗生素的大量应用,SAU 对各种抗菌药物的耐药率有上升趋势,尤其是 MRSA 的出现,使得 SAU 感染变得更加棘手^[10-13]。因此,及时准确地对 MRSA 进行鉴定极为重要,为临床治疗提供有效的治疗方案。同时,对 MRSA 进行同源性分析,明确其感染和传播途径,以便采取有效的控制措施,预防院内感染或暴发流行^[14-16]。随着质谱技术在医学领域的应用,细菌的鉴定速度

和准确率得到飞速提升,然而细菌耐药性检测还是需要传统的药物敏感试验,耗时费力。本研究探讨梅里埃 VITEK MS 质谱仪在快速诊断 MRSA 的使用价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 选取 2023 年 7—12 月舟山医院检验中心微生物实验室分离得到的 120 株 SAU,均为门诊或住院患者的细菌培养分离菌株,去除同一患者同一部位重复菌株。SAU 的鉴定基于 VITEK 2 Compact 全自动细菌分析仪和梅里埃 VITEK MS 质谱仪。

1.2 试剂及仪器 AST-GP67 药敏卡及 VITEK 2 Compact 全自动细菌分析仪购于法国生物梅里埃公司,头孢西丁药敏纸片购于英国 Oxoid 公司,血琼脂培养基、M-H 琼脂培养基购于安图生物公司,甲酸、基质液及一次性靶板均由生物梅里埃公司生产,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS)为生物梅里埃公司的 VITEK MS。

1.3 方法

1.3.1 菌株培养和耐药性鉴定 从-80℃低温冰箱

基金项目: 舟山市医药卫生科技计划项目(2024YB06)

作者单位: 316021 浙江省舟山,舟山医院

通信作者: 周陈浩,Email: 392833020@qq.com

移出 120 株 SAU,待温度稳定至室温,接种于血琼脂培养基中,35 ℃ CO₂ 恒温箱孵育 24 h。SAU 用 VITEK2 Compact 的药敏卡 AST-GP67 进行药敏试验,结果参照《M100 抗微生物药物敏感性试验执行标准》,根据药敏结果筛选出 MRSA。质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC29213,粪肠球菌 ATCC29212。同时采用 CLSI 推荐的 30 μg 头孢西丁纸片法检测 MRSA,将头孢西丁纸片贴在接种有 SAU 菌悬液的 M-H 培养基上,35 ℃ 恒温箱孵育 24 h 测量抑菌环,直径≤21 mm 则判定为 MRSA。通过两种方法筛选出 MRSA。

1.3.2 MRSA 及 MSSA 的质谱峰图 选取在血琼脂平板上生长 24 h 的新鲜细菌菌落,将其涂抹在 VITEK MS-DS 靶板上,形成菌落薄膜。将 0.5 μl 的甲酸引入薄膜,并在室温下干燥。随后,加入 1 μl 的 VITEK MS-CHCA 基质溶液,待干燥后放入 VITEK MS 仪器,获取细菌全细胞蛋白(主要是核糖体蛋白)质谱峰图。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC8739。

1.3.3 MRSA 质谱峰模型建立及验证 选取部分 SAU 质谱峰数据,通过 ClinPro Tools 软件编辑参数,分组调入建模所需的各组蛋白质质谱数据,利用遗传算法选择两组差异最显著的蛋白质,建立 MRSA 的预测模型,并用剩余 SAU 验证该模型对区分 MRSA 和 MSSA 的鉴定价值。

1.3.4 VITEK-MS 聚类 and 耐药表型分析 将 44 株 MRSA 的数据图谱导入至 VITEK-MS SARAMIS Premium 软件的图形数据库中,进行聚类分析。在相同菌种范畴内,当不同菌株彼此间的相似度达到 85%及以上时,便将这些菌株判定为同源菌株,依据此标准针对聚类树实施质谱分型。最终,用 MS-I、MS-II、MS-III、MS-IV、MS-V 和 MS-VI 指代所划分出的不同型别。从 LIS 数据库导出 44 株 MRSA 药敏结果,通过 WHONET 5.6 软件进行耐药谱分析,根据抗菌药物敏感性结果分为 6 个耐药模式,用模式 1~6 表示。对聚类类型与药敏表型进行比较,判断两种方法在 MRSA 源性上的差异。

2 结果

2.1 MRSA 及 MSSA 质谱峰图 质荷比 2 200、3 008、4 309 为 SAU 的特征峰,质荷比在 2 200 时

MSSA 峰值小于 MRSA,质荷比在 3 008 时 MRSA 峰值大于 MSSA,不同 MRSA 菌株之间的相对峰值稍有差异,见图 1~2。

2.2 MRSA 质谱峰模型验证 通过两种药敏试验筛选出 MRSA 44 株,MSSA 76 株。随机抽取 30 株 MRSA 和 40 株 MSSA,以此为基础构建 ClinPro Tools 模型。借助分类衡量标准明确峰质荷比处于 2 300 Da 和 3 000 Da 位置的峰为 MRSA 的关键特征峰。

运用剩余的 50 株样本对模型进行验证。仅依靠特征峰 1,灵敏度为 71.4%,特异度为 75.0%;仅凭借特征峰 2,灵敏度为 64.3%,特异度为 72.2%;特征峰 1,2 联合,灵敏度为 78.6%,特异度为 83.3%,见表 1。

2.3 MALDI-TOF MS 源性 44 株 MRSA 可归为 6 种不同的型别,其中 I 型 18 株,II 型 4 株,III 型 12 株,IV 型 2 株,V 型 3 株,VI 型 5 株,见图 3。

2.4 耐药表型 对青霉素、苯唑西林耐药的模式 1 是主要的耐药模式(17 株,占 38.6%),对青霉素、苯唑西林、四环素耐药的模式 2,有 2 株;对青霉素、苯唑西林、红霉素、克林霉素耐药的模式 3,有 14 株;对青霉素、苯唑西林、红霉素、克林霉素、四环素耐药的模式 4,有 3 株;对青霉素、苯唑西林、环丙沙星、左氧氟沙星、红霉素、克林霉素耐药的模式 5,有 3 株;对青霉素、苯唑西林、庆大霉素、环丙沙星、左氧氟沙星、红霉素、克林霉素、四环素耐药的模式 6,有 5 株。分离株来自不同样本种类,药敏谱不全相同。

2.5 MALDI-TOF MS 和耐药表型结果一致性比较 通过 MALDI-TOF MS 聚类分析得到 MS-I 型 18 株,而耐药模式 1 有 17 株,几乎接近,可以判断其源性;MS-III 型 12 株,模式 3 有 14 株,也存在亲缘属性;MS-VI 型 5 株和模式 6 数量完全一致,菌株多重耐药,亲缘关系接近;其他型别和模式数量较少,无法判断其一致性。

3 讨论

SAU 作为条件致病菌,存在于人体的鼻腔、腋窝、腹股沟和阴道黏膜上,当机体免疫力减弱时,鼻

表 1 VITEK MS 质谱法检测结果

药敏试验	特征峰 1		特征峰 2		特征峰 1,2 联合	
	MRSA	MSSA	MRSA	MSSA	MRSA	MSSA
MRSA	10	4	9	5	11	3
MSSA	9	27	10	26	6	30

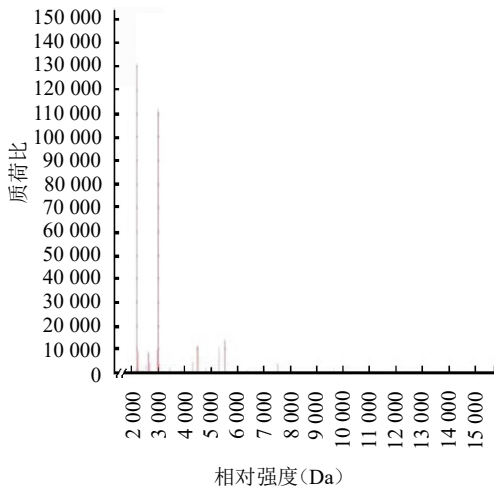
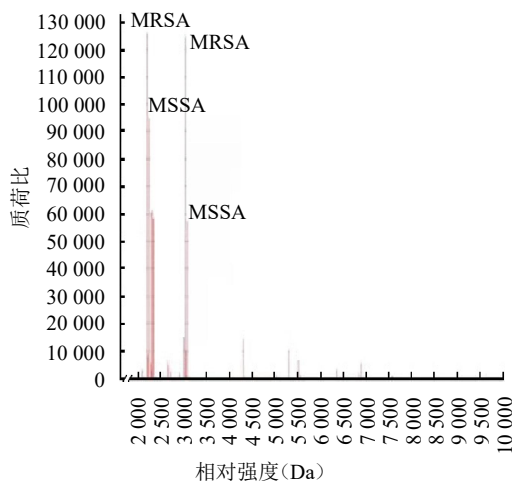


图 1 金黄色葡萄球菌特征峰



注:MRSA 为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌,MSSA 为甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌

图 2 部分 MRSA 及 MSSA 在 2 000 ~ 7 000 质谱峰图

腔定植细菌的移位或吸入是继发性肺部细菌感染的主要原因。极易诱发化脓感染,部分患者发展为坏死性肺炎,甚至出现休克,同时可并发全身的脓毒血症、骨髓炎等^[17-19]。2023 年 CHINET 临床主要菌种分布中,SAU 位居第三,MRSA 占 37.5%。由于 SAU 感染率不断上升,临床所用的抗菌药物更加广泛,这就导致 SAU 的耐药率也逐年提升,特别是 MRSA 的广谱耐药性,对绝大多数的抗菌药物均出现不同程度的耐药。然而根据国内外指南规定 MSSA 和 MRSA 在治疗方案中大相径庭^[20-23],快速而准确地鉴定 MRSA,选择合适的抗菌药物有助于治疗 SAU 引起的感染疾病。

MALDI-TOF MS 是一种测量离子质荷比的分析方法,基于微生物特征蛋白指纹图谱的快速鉴定技术,与传统微生物鉴定方法相比,它可以在几分钟

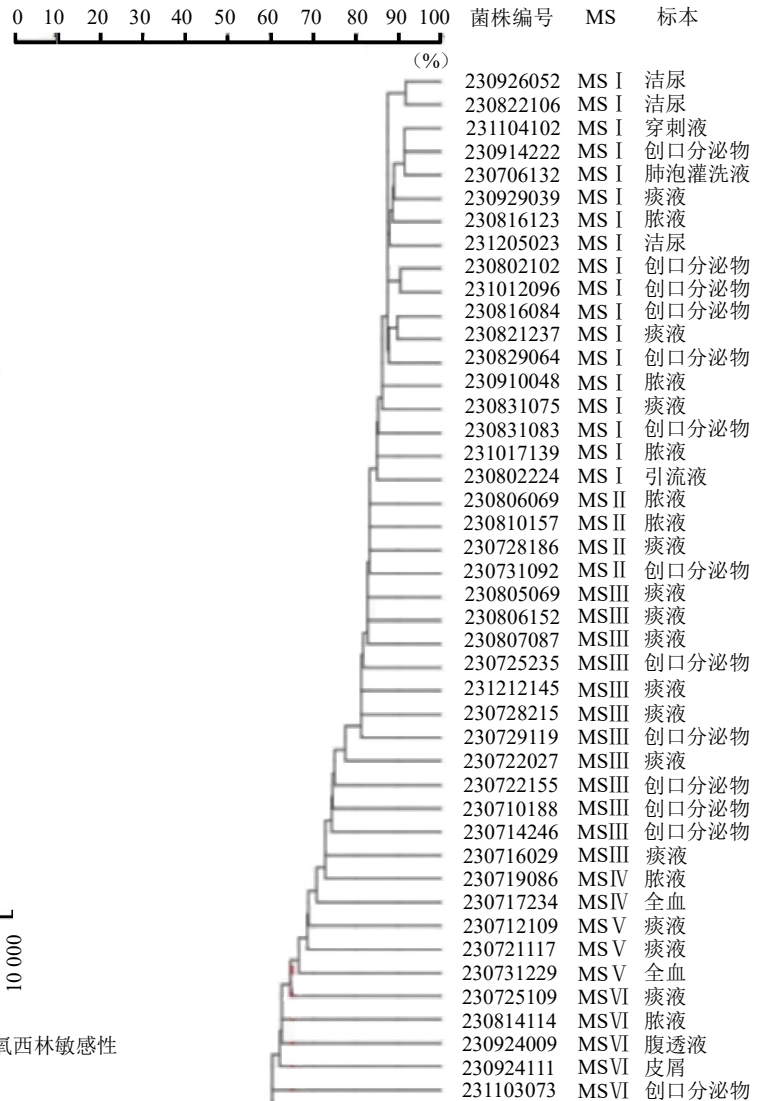


图 3 MRSA 同源性聚类图(MALDI-TOF MS)

内完成微生物菌种水平的鉴定,具有简单、快速、稳定、高通量、经济高效等优势。然而该技术在细菌耐药性方面作用有限,还是得依靠传统的体外药物敏感试验。近年来,也有学者对质谱技术在细菌耐药性检测方面展开研究,如 MRSA 的检测,万古霉素耐药的肠球菌(VRE)检测,革兰阴性杆菌耐药性检测等。

本研究使用 ClinPro Tools 软件统计 VITEK MS 对 MRSA 及 MSSA 生成的质谱峰图,分析两组特异峰,建立模型。结果显示,SAU 120 株中 MRSA 44 株(36.7%),MSSA 76 株(63.3%)。随机挑选 MRSA 30 株,MSSA 40 株创建 ClinPro Tools 模型,通过分类标准发现峰质荷比 2 300 Da 和 3 000 Da 是 MRSA 的关键特征峰。质谱法结果提示特征峰 1 灵敏度 71.4%,特异度 75.0%;特征峰 2 灵敏度 64.3%,特异

度 72.2%; 特征峰 1, 2 联合灵敏度为 78.6%, 特异度为 83.3%。与吴文强等^[24]研究结果相近。通过 MALDI-TOF MS 聚类分析结果与耐药表型分析结果比较显示, MS-I 型 18 株细菌和耐药模式 1 几乎接近, 可以判断其同源性; MS-III 型 12 株细菌和模式 3 也存在亲缘属性; MS-VI 型 5 株和模式 6 数量完全一致, 菌株多重耐药, 亲缘关系接近; 其他型别和模式数量较少, 无法判断其一致性。

综上所述, MALDI-TOF MS 法在 MRSA 及 MSSA 快速鉴定中, 特异度及灵敏度表现良好。通过 MALDI-TOF MS 聚类分析细菌同源性是比耐药表型分析同源性更简单、快捷的有效方法, 对于预判医院感染暴发、感染途径和定植规律, 判断复发患者是原发性或继发性感染及耐药菌的诊治都具有重要意义^[25-26]。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 周陈浩: 实验操作、论文撰写、论文修改; 陈琼娜、李春儿: 数据整理、统计学分析; 鲍舟君: 研究指导

参 考 文 献

- [1] CHEUNG G Y C, BAE J S, OTTO M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*[J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 547-569.
- [2] CIEZA M Y R, BONSAGLIA E C R, RALL V L M, et al. Staphylococcal enterotoxins: Description and importance in food[J]. *Pathogens*, 2024, 13(8): 676.
- [3] GHERARDI G. *Staphylococcus aureus* infection: Pathogenesis and antimicrobial resistance[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9): 8182.
- [4] CHEN H Q, ZHANG J Y, HE Y, et al. Exploring the role of *Staphylococcus aureus* in inflammatory diseases[J]. *Toxins (Basel)*, 2022, 14(7): 464.
- [5] CASSAT J E, THOMSEN I. *Staphylococcus aureus* infections in children[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2021, 34(5): 510-518.
- [6] WEI M, KNIGHT S A B, FAZELINIA H, et al. An exploration of mechanisms underlying *Desemzia incerta* colonization resistance to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the skin[J]. *mSphere*, 2024, 9(3): e0063623.
- [7] HSIEH R C, LIU R, BURGIND J, et al. Understanding mechanisms of virulence in MRSA: Implications for antivirulence treatment strategies[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2023, 21(9): 911-928.
- [8] 柯春海, 吴军华, 吕勤. 儿童重症感染耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药及毒力携带分析[J]. *现代实用医学*, 2020, 32(9): 1074-1077.
- [9] HATLEN T J, MILLER L G. Staphylococcal skin and soft tissue infections[J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2021, 35(1): 81-105.
- [10] GUO Y L, SONG G H, SUN M L, et al. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 107.
- [11] KLEINHENZ M, BEESETTY P, YANG C, et al. Antibiotic treatment of *Staphylococcus aureus* infection inhibits the development of protective immunity[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2022, 66(4): e0227021.
- [12] MCGUIRE E, BOYD A, WOODS K. *Staphylococcus aureus* bacteremia[J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(10): 2765-2766.
- [13] 汪宗林, 陈建荣, 尤忠毓, 等. 金黄色葡萄球菌生物被膜形成与耐药机制的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(7): 2038-2051.
- [14] AN N V, HAI L H L, LUONG V H, et al. Antimicrobial resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolated at a general hospital in Vietnam between 2014 and 2021[J]. *Infect Drug Resist*, 2024, 17: 259-273.
- [15] 林元爽, 杨绍佑, 潘晓峰. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 180 株的临床分布及耐药分析[J]. *现代实用医学*, 2018, 30(3): 351-352, 420-421.
- [16] MLYNARCZYK-BONIKOWSKA B, KOWALEWSKI C, KROLAK-ULINSKA A, et al. Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15): 8088.
- [17] CARREL M, SMITH M, SHI Q Y, et al. Antimicrobial resistance patterns of outpatient *Staphylococcus aureus* isolates[J]. *JAMA Netw Open*, 2024, 7(6): e2417199.
- [18] NING K M, ZHOU R S, LI M X. Antimicrobial resistance and molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk in Hunan Province[J]. *PeerJ*, 2023, 11: e15847.
- [19] ZHANG J R, TU J J, CHEN Y P, et al. Clinical characteristics and homology analysis of *Staphylococcus aureus* from wound infection at a tertiary hospital in southern Zhejiang, China[J]. *BMC Microbiol*, 2023, 23(1): 217.
- [20] SWETS M C, BAKK Z, WESTGEEST A C, et al. Clinical subphenotypes of *Staphylococcus aureus* bacteremia[J]. *Clin Infect Dis*, 2024, 79(5): 1153-1161.
- [21] THORNLEY E M, ALEXANDER R, POPELKA J, et al. Risk factors for persistent *Staphylococcus aureus* bacteremia in children[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2024, 43(11): 1040-1045.
- [22] CHOI S H, DAGHER M, RUFFIN F, et al. Risk factors for recurrent *Staphylococcus aureus* bacteremia[J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 72(11): 1891-1899.
- [23] LEGG A, MEAGHER N, JOHNSON S A, et al. Risk factors for nephrotoxicity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: A post hoc analysis of the CAMERA2 trial[J]. *Clin Drug Investig*, 2023, 43(1): 23-33.
- [24] 吴文强, 仇玉兰. 质谱对甲氧西林耐药和甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌的鉴定价值[J]. *重庆理工大学学报(自然科学)*, 2019, 33(8): 198-202.
- [25] GANT M S, CHAMOT-ROOKE J. Present and future perspectives on mass spectrometry for clinical microbiology[J]. *Microbes Infect*, 2024, 26(7): 105296.
- [26] VENA A, CASTALDO N, MAGNASCO L, et al. Current and emerging drug treatment strategies to tackle invasive community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection: What are the challenges?[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2023, 24(3): 331-346.

收稿日期: 2025-01-12

(本文编辑: 孙海儿)