

doi: 10.3969/j.issn.1674-1242.2025.06.009

MALDI-TOF MS 快速检测碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌的应用研究

汤英贤, 林劲伟, 王娟, 陈凌娟, 徐令清

[广州医科大学附属清远医院(清远市人民医院)检验科, 广东 清远 511500]

【摘要】目的 探讨基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术在碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌(CRE)快速检测中的应用价值。**方法** 收集2023年1月至2024年12月临床分离的CRE可疑肠杆菌科菌株104株。PCR检测bla_{KPC}、bla_{NDM}、bla_{VIM}、bla_{IMP}等基因,与MALDI-TOF MS检测结果进行对比。采集特征质谱峰并进行图谱分析,构建受试者工作特征(ROC)曲线评估诊断效能。**结果** PCR检出碳青霉烯酶阳性菌株73株(70.19%),MALDI-TOF MS检测方法诊断灵敏度与特异度分别为92.31%、95.12%。ROC曲线下面积(AUC)达0.880, Kappa值为0.873 ($P<0.001$),显示与PCR结果高度一致。**结论** MALDI-TOF MS能在短时间内实现对CRE的准确识别,具有操作简便、特异性强、时效性高等优势,为CRE早期筛查及耐药机制预警提供了检测途径。

【关键词】 MALDI-TOF MS; 碳青霉烯酶; 肠杆菌科细菌; 耐药性; 早期筛查

【中图分类号】 R372

【文献标志码】 A

文章编号: 1674-1242(2025)06-0893-07

Application of MALDI-TOF MS for Rapid Detection of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae

TANG Yingxian, LIN Jinwei, WANG Juan, CHEN Lingjuan, XU Lingqing

[Department of Laboratory Medicine, Qingyuan Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University
(Qingyuan People's Hospital), Qingyuan, Guangdong 511500, China]

【Abstract】Objective To evaluate the application value of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in the rapid detection of carbapenem-resistant enterobacteriaceae (CRE). **Methods** A total of 104 suspected CRE strains were collected from January 2023 to December 2024. PCR detection of genes such as bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, and bla_{IMP} was compared with MALDI-TOF MS results. Characteristic mass spectrometry peaks were collected and analyzed, and receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed to evaluate diagnostic performance. **Results** PCR detected 73 carbapenemase-positive strains (70.19%). The diagnostic sensitivity and specificity of the MALDI-TOF MS method were 92.31% and 95.12%, respectively. The area under the ROC curve (AUC) reached 0.880, with a Kappa value of 0.873 ($P<0.001$), indicating high concordance with PCR results. **Conclusion** MALDI-TOF MS enables rapid and accurate identification of CRE, offering advantages such as ease of operation, high specificity, and timely results. This provides a detection pathway for early screening of CRE and

收稿日期: 2025-08-21。

基金项目: 2022 年度清远市科技计划自筹经费项目(221105147684600)。

作者简介: 汤英贤(1984—), 男, 广东清远人, 本科学历, 副主任技师, 从事微生物耐药性检测及同源性分析的研究。邮箱: 224841975@qq.com。

early warning of resistance mechanisms.

【Key words】MALDI-TOF MS; Carbapenemase; Enterobacteriaceae ; Drug Resistance; Early Screening

0 引言

随着抗菌药物的不合理应用,碳青霉烯类抗生素逐渐成为治疗多重耐药革兰阴性菌感染的最后屏障^[1-2]。近年来,我国碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌(Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae, CRE)感染率持续上升,且碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌的检出率呈地域性、医院等级相关性递增的趋势,已对临床治疗产生严峻挑战^[3]。

碳青霉烯类耐药性机制极其复杂^[4],其中产碳青霉烯酶是 CRE 最核心的耐药机制,常见的碳青霉烯酶包括 KPC、NDM、VIM、IMP 等,其基因具有强传播性,易携带于可移动遗传元件中,在院内及社区间快速扩散^[5]。因此,如何快速识别 CRE 及产酶分型,对指导合理用药、加强院感防控并优化临床预后具有重要意义。

当前包括药敏试验和分子生物学手段等在内的传统 CRE 检测方法存在检测效率与临床时效性矛盾,亟需高通量、短时间、低成本的新技术加以突破。近年来,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)技术通过分析细菌蛋白质指纹图谱,可在短时间内实现物种层级的准确鉴定,且已逐步拓展至细菌耐药性识别领域,尤其在产碳青霉烯酶菌株的特征峰识别、代谢物变化等方面显示出应用潜力^[6-7]。基于此,本研究探讨 MALDI-TOF MS 在 CRE 快速检测中的价值,旨在为临床早期筛查及耐药性预警提供检测途径。

1 材料与方法

1.1 菌株来源与鉴定

本研究收集自 2023 年 1 月至 2024 年 12 月清远市人民医院临床标本中分离的肠杆菌科细菌共 104 株。为避免重复计入,如同一患者在 30 天内来源于同一标本类型(如痰液、尿液、血液等)且菌种及耐药谱一致者,仅保留首次分离株;若为不同标本来源或间隔 ≥ 30 天且药敏谱存在差异者,则

视为独立菌株纳入分析。初筛标准为亚胺培南或美罗培南最小抑菌浓度(MIC) $\geq 2\mu\text{g/mL}$ 。所有菌株均经 Phoenix M50 全自动细菌鉴定药敏分析系统进行物种鉴定和药敏测试,并使用 KB 纸片扩散法(依据 CLSI M100—2023 标准)对碳青霉烯类抗生素敏感性结果进行复核。标准菌株:碳青霉烯类耐药对照株为 *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705,碳青霉烯类敏感对照株为肺炎克雷伯菌 ATCC 700603。

1.2 DNA 提取与碳青霉烯酶基因检测

1.2.1 DNA 提取

采用金属浴裂解法提取菌株总 DNA。操作步骤如下:选取经纯培养后的新鲜单菌落 3~5 个,接入含 300 μL 无核酸酶双蒸水的 1.5mL EP 管中,剧烈震荡混匀。样本在 95 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中加热裂解 10min 后,12000rpm 离心 5min,取上清液作为 DNA 模板备用。

1.2.2 PCR 扩增

采用 Taq 酶体系进行碳青霉烯酶基因扩增,靶向 bla_KPC、bla_NDM、bla_IMP、bla_VIM 四种主要碳青霉烯酶基因。反应体系总量为 20 μL ,包括:2 \times Taq PCR Master Mix 10 μL ,正反向引物各 0.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$),模板 DNA 1.5 μL ,ddH₂O 补足至 20 μL 。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5min,随后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45s,共 32 个循环,最终 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10min。

PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分离,并在 Bio-Rad 凝胶成像系统中观察条带。阳性扩增产物送商业公司进行双向测序,并通过 NCBI BLAST 进行序列比对以确认碳青霉烯酶基因亚型。

1.3 MALDI-TOF MS 质谱检测

1.3.1 样本处理与孵育

将目标菌株复苏后制备不同 McFarland 浓度(0.5、1.0、2.0)的菌悬液。配制 1mg/mL 浓度的亚胺培南及美罗培南溶液(使用无菌水溶解纯粉制剂),分别与菌悬液以 1:1 比例混合,并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条

件下孵育 10min、20min、30min。每一条件设置三重孔。

1.3.2 靶板制备与质谱采集

每个样品取上清液 1 μ L 加于 MALDI 靶板上，室温干燥后再加 1 μ L 饱和基质液（ α -氰基-4-羟基肉桂酸，HCCA，溶于 50% 乙腈 / 2.5% 三氟乙酸溶液中），再次干燥后加载 Bruker MALDI Biotyper（Bruker Daltonics, Germany）系统进行质谱分析。仪器参数：正离子模式，线性检测模式，扫描范围 100~1000m/z，激光频率 60Hz，离子源电压 IS1 为 10kV，IS2 为 8.94kV。

1.3.3 数据处理与特征峰判定

使用 FlexControl 与 ClinProTools 软件进行基线校正与去噪平滑处理，建立自动化特征峰识别流程

以模拟“集成判读模块”，减少人工依赖并提升检测效率。重点分析样本在（300 \pm 0.55）m/z 处亚胺培南峰的出现。检测结果与 PCR 产物进行比对，评估一致性。MALDI-TOF MS 系统集成与工程应用流程示意图及特征峰自动判读示意图见图 1、图 2。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据处理。以 PCR 检测结果作为“金标准”，计算 MALDI-TOF MS 检测的灵敏度、特异度、阳性预测值（PPV）、阴性预测值（NPV）及总体准确率，并用 Kappa 一致性检验评估方法间的一致性。ROC 曲线分析采用非参数 DeLong 法计算曲线下面积（AUC）及其 95% 置信区间（95% CI），用于评估检测方法对产

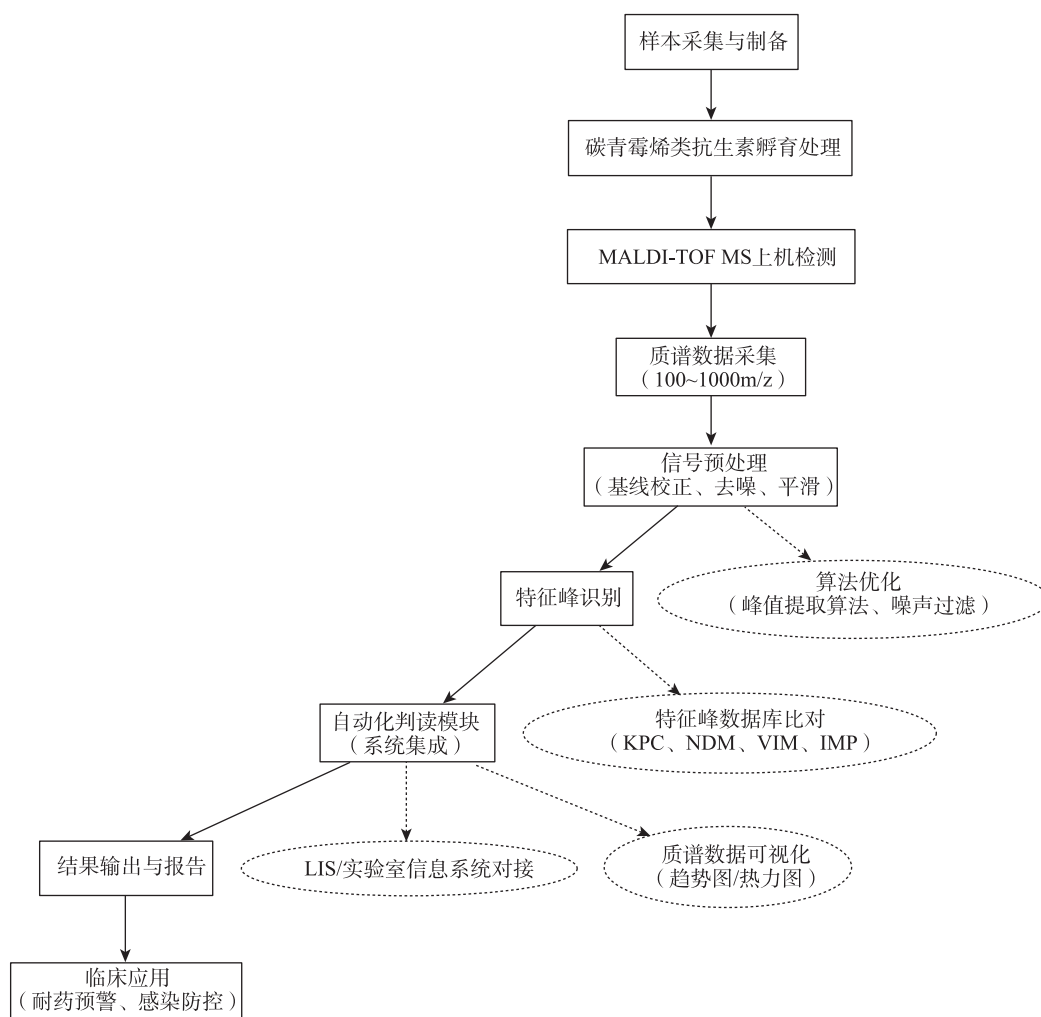


图 1 MALDI-TOF MS 系统集成与工程应用流程示意图

Fig.1 Schematic diagram of system integration and engineering application process of MALDI-TOF MS

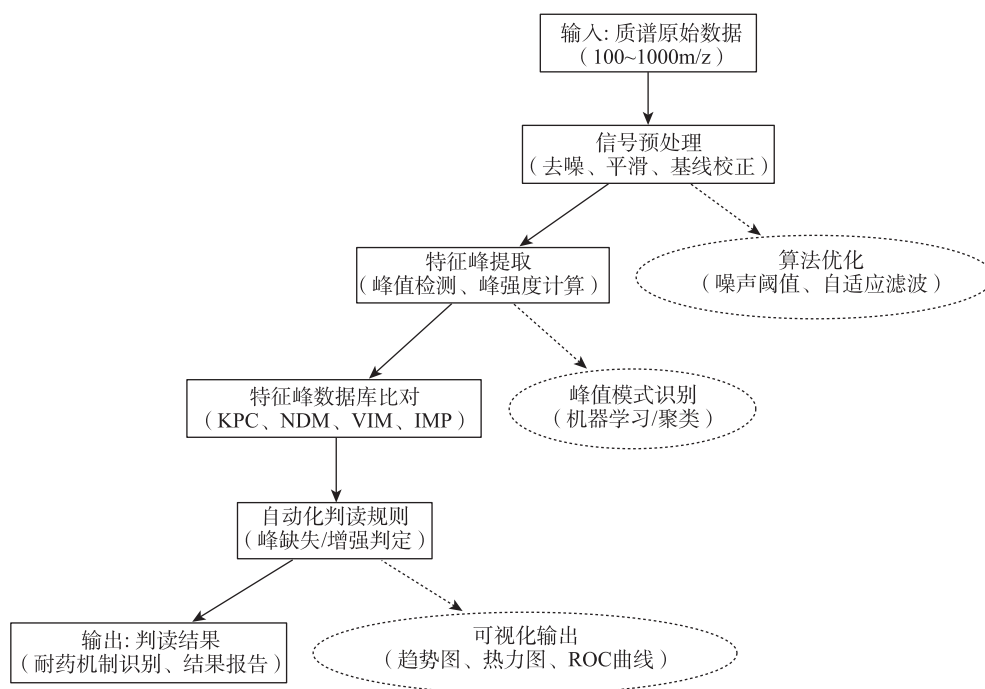


图2 特征峰自动判读示意图

Fig.2 Schematic diagram of automatic interpretation of characteristic peaks

碳青霉烯酶菌株的判别效能。灵敏度和特异度的比较采用双侧检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 菌株构成与碳青霉烯类抗生素耐药情况

本研究共纳入肠杆菌科细菌 104 株, 其中以肺炎克雷伯菌为主, 共 60 株, 占比 57.69%; 其次为大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 28 株 (26.92%), 产酸克雷伯菌 8 株 (7.69%), 肠杆菌属 8 株 (7.69%)。所有菌株对亚胺培南或美罗培南的最低抑菌浓度 (MIC) 均 $\geq 2.00\mu\text{g/mL}$, 满足 CRE 初筛标准。肠杆菌科细菌菌种构成与耐药情况详见表 1。

表1 肠杆菌科细菌菌种构成与耐药情况 ($n=104$)
Tab.1 Composition and resistance of Enterobacteriaceae bacterial strains ($n=104$)

菌种	菌株数 (n)	占比 (%)	亚胺培南 MIC \geq 2.00 $\mu\text{g/mL}$	美罗培南 MIC \geq 2.00 $\mu\text{g/mL}$
肺炎克雷伯菌	60	57.7	60	58
大肠埃希菌	28	26.9	28	27
产酸克雷伯菌	8	7.7	8	8
肠杆菌属	8	7.7	8	7
合计	104	100	104	100

2.2 碳青霉烯酶基因分型结果

PCR 扩增及测序共检出碳青霉烯酶阳性菌株 73 株, 占总菌株数的 70.19%。其中, bla_KPC 型 36 株 (49.32%), bla_NDM 型 25 株 (34.25%), bla_VIM 型 7 株 (9.59%), bla_IMP 型 5 株 (6.85%)。PCR 检测碳青霉烯酶基因分布详见表 2。

表2 PCR 检测碳青霉烯酶基因分布 ($n=73$)
Tab.2 Distribution of carbapenemase genes detected by PCR ($n=73$)

基因型	检出数 (n)	占PCR阳性比例 (%)	占总菌株数比例 (%)
bla_KPC	36	49.32	34.62
bla_NDM	25	34.25	24.04
bla_VIM	7	9.59	6.73
bla_IMP	5	6.85	4.81
合计	73	100	70.19

2.3 MALDI-TOF MS 特征峰表达分析

在 MALDI-TOF MS 检测中, bla_KPC 阳性菌中有 34 株在 (300 ± 0.55) m/z 处出现特征峰缺失, 占比 94.44%; bla_NDM 阳性菌中有 22 株在 199m/z 处出现增强峰, 占比 88.00%。MALDI-TOF MS 特征峰与酶型对应分析详见表 3。

表 3 MALDI-TOF MS 特征峰与酶型对应分析 (n=73)
Tab.3 Correlation analysis between MALDI-TOF MS characteristic peaks and enzyme types (n=73)

酶型	样本数	(300±0.55) m/z 峰消失 (例)	占比 (%)	199 m/z峰出现 (例)	占比 (%)
bla_KPC	36	34	94.44	5	13.89
bla_NDM	25	4	16	22	88
bla_VIM	7	2	28.57	3	42.86
bla_IMP	5	1	20	2	40

2.4 MALDI-TOF MS 检测性能评价

以 PCR 结果为参照标准, MALDI-TOF MS 在本研究中检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的灵敏度为 92.31%, 特异度为 95.12%, 阳性预测值为 95.89%, 阴性预测值为 90.32%, 总准确率为 93.27%。Kappa 一致性系数为 0.873 ($P<0.05$), 表明方法间具有高度一致性。采用 ROC 曲线评估 MALDI-TOF MS 方法在产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌 (CRE) 检测中的诊断效能 (见图 3), 结果显示 AUC 值为 0.880, 提示该检测方法具有极高的判别能力。MALDI-TOF 质谱与 PCR 检测一致性评估见表 4。

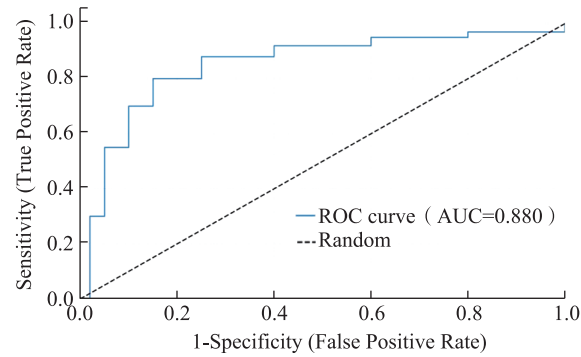


图 3 ROC 曲线图
Fig.3 ROC curve

表 4 MALDI-TOF 质谱与 PCR 检测一致性评估 (n=104)
Tab.4 Evaluation of consistency between MALDI-TOF MS and PCR detection (n=104)

指标名称	数值 (%)
灵敏度 (Sensitivity)	92.31
特异度 (Specificity)	95.12
阳性预测值 (PPV)	95.89
阴性预测值 (NPV)	90.32
总体准确率 (Accuracy)	93.27
Kappa值	0.873
P值	0.001

3 讨论

随着碳青霉烯类抗生素耐药性的加剧, 临床对快速、准确识别 CRE 提出了更高要求^[8]。研究结果显示, MALDI-TOF MS 作为一种新兴的病原检测技术, 在 CRE 识别中呈现良好的敏感性 (92.31%) 与特异性 (95.12%), 其 AUC 高达 0.880, 表明该方法在鉴别 CRE 方面具有极高的判别能力。

在特征峰识别方面, bla_KPC 阳性菌在 (300±0.55) m/z 处的峰消失率达 94.44%, 表现出与质谱响应高度相关的质荷比指征。NDM 型菌株则主要在 199m/z 附近呈现强烈峰值信号, 本研究中其表达率为 88.00%, 同样印证了刘婷婷等^[9]提出的 199m/z 为 NDM 型特异水解产物的报告。相比之下, VIM 和 IMP 型菌株的特征峰分布较为分散, 表达比例偏低, 可能与其产酶机制、表达水平或与抗生素的亲合特性有关, 提示该类酶型的质谱识别仍需进一步优化信号提取方法。与既往研究相比, 本研究结果关于 NDM 型菌株特征峰定位的结论一致, 均证实 199m/z 附近信号具有较高特异性。然而, 与国内部分研究相比, KPC 型特征峰识别率略高, 可能与样本来源以南方地区为主、KPC 酶型表达水平较强有关。从检测方法学角度看, MALDI-TOF MS 相较于 Carba NP 试验与改良 Carba Blue 法具有明显优势。Carba NP 依赖酶促水解导致 pH 指示剂变色, 虽成本低、原理简洁, 但对低表达菌株或复合耐药菌株的敏感性不足 (灵敏度仅约 80%), 且需 1~2h 反应时间; 而 MALDI-TOF MS 能在数分钟内获取特征峰信号, 兼具速度快、定量化和可自动判读的特点。此外, 与新一代测序 (NGS) 相比, MALDI-TOF MS 虽无法直接提供基因型序列信息, 但在临床可及性、操作复杂度及经济成本方面具有显著优势, 适合用于常规实验室的快速初筛与机制预警。NGS 技术更适用于耐药基因流行病学研究与溯源分析, 而 MALDI-TOF MS 可作为其前置筛查环节, 实现“表型—分子—机制”多层验证的闭环。传统 CRE 检测依赖 KB 纸片扩散法或 PCR 技术, 虽然具有一定标准化基础, 但存在时间周期长、成本较高或设备要求较高等问题。在急性感染或 ICU 患者快速决策中, 传统药敏报告的滞后可能导致治

疗延误,影响病情转归。而 MALDI-TOF MS 通过识别蛋白质或代谢产物形成的质谱图谱,在数小时内即可完成菌种与耐药表型的初筛,为临床提供了“窗口期”内干预的可能。本研究中的特征峰建立和定量信号采集步骤,使得质谱图不仅可用于物种识别,还具备对耐药机制做出初步判断的能力,扩展了 MALDI-TOF MS 在 CRE 防控策略中的应用边界。研究发现,不同酶型对特征峰的依赖模式不尽相同。KPC 型菌株主要通过水解碳青霉烯类药物导致质谱信号的“缺失”,而 NDM 型则因产生特定水解产物而在特定 m/z 区间形成“增强峰”。这种机制上的差异,为质谱诊断算法的精准优化提供了理论依据。本研究的酶型以 KPC 和 NDM 为主,这一分布特征与我国近年 CRE 流行趋势基本一致。文献报道 KPC 在华东与中南地区占比接近 60%,NDM 则在华北、西南等区域广泛存在^[10]。因此,本研究所构建的峰值识别体系具有一定的区域适应性基础,但其对 VIM、IMP 等低丰度耐药基因的识别能力仍需通过样本扩增与酶型覆盖的扩大进一步验证。

尽管本研究验证了 MALDI-TOF MS 在 CRE 快速检测中的潜力,但也存在若干局限性。首先,特征峰识别在样品制备、仪器稳定性、数据处理算法方面仍存在一定依赖性,缺乏标准化模型;其次,对于质谱检测阴性而 PCR 阳性的菌株,尚需结合分子机制进一步解析其信号缺失原因;此外,受限单中心数据和样本数量,对检测系统的广泛推广尚需更大规模、多中心验证研究。

综上所述, MALDI-TOF MS 不仅可用于肠杆菌科细菌的快速识别,还具备辅助判定碳青霉烯酶类型的潜力。随着特征峰数据库的持续扩展和算法模型的不断优化,该技术有望在 CRE 早期筛查、耐药机制预警及院感防控中发挥重要作用。未来研究应聚焦于系统集成与工程化应用方面,如可与临床检验信息管理系统(Laboratory Information System, LIS)和自动化前处理平台对接,实现从样本制备到结果判读的全流程集成,推动 MALDI-TOF MS 的临床应用空间。

参考文献

- [1] BOOPATHI S, KUMAR RMS, PRIYA PS, *et al.* Gut Enterobacteriaceae and uraemic toxins:perpetrators for ageing[J]. *Exp Gerontol*, 2023(173): 112088.
- [2] 薛阿琳, 王美霞, 庄贵华. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的感染特征和危险因素[J]. *中国卫生标准管理*, 2023, 14(5): 169-173.
XUE Alin, WANG Meixia, ZHUANG Guihua. Infection characteristics and risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. *China Health Standard Management*, 2023, 14(5):169-173.
- [3] 陈淑娟, 曾建英, 胡丽娟. 某院耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的临床特征及耐药基因分析[J]. *中外医学研究*, 2022, 20(22): 76-80.
CHEN Shujuan, ZENG Jianying, HU Lijuan. Clinical characteristics and drug resistance gene analysis of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a hospital[J]. *Chinese and Foreign Medical Research*, 2022, 20(22): 76-80.
- [4] 肖晓, 杭修兵, 王梦, 等. 耐碳青霉烯类肠杆菌目细菌耐药性、临床感染特征及 *mcr* 基因分析[J]. *中国感染控制杂志*, 2023, 22(1): 31-37.
XIAO Xiao, HANG Xiubing, WANG Meng, *et al.* Antimicrobial resistance, clinical infection characteristics and *mcr* genes of carbapenem-resistant Enterobacterales[J]. *Chinese Journal of Infection Control*, 2023, 22(1): 31-37.
- [5] JEAN SS, HARNOD D, HSUEH PR. Global threat of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022(12): 823684.
- [6] 吕辉, 范明琴, 陈美红, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪检测耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的价值[J]. *实用医技杂志*, 2024, 31(6): 409-413, F0003.
LYU Hui, FAN Mingqin, CHEN Meihong, *et al.* The value of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in detecting carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Journal of Practical Medical Techniques*, 2024, 31(6): 409-413, F0003.
- [7] 张可昕, 胡翀, 陈琛, 等. 基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱系统的血流感染致病菌早期检测[J]. *解放军医学杂志*, 2018, 43(1): 17-22.
ZHANG Kexin, HU Chong, CHEN Chen, *et al.* Early detection of the bloodstream infection bacteria based on MALDI-TOF MS[J]. *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2018, 43(1): 17-22.
- [8] 王勋松, 黄丽芳. 肿瘤医院耐碳青霉烯类抗生素肠杆菌科细菌的分布特点及耐药性分析[C]//中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会, 中国抗癌协会青年理事会. 2019 年中国肿瘤标志物学术大会暨第十三届肿瘤标志物青年科学家论坛论文集. 江西省肿瘤医院; 南昌大学

公共卫生学院, 2019: 178-179.

WANG Xunsong, HUANG Lifang. Distribution characteristics and resistance analysis of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae bacteria in tumor hospitals[C]//Cancer Marker Professional Committee of China Anti Cancer Association, Youth Council of China Anti Cancer Association. Proceedings of the 2019 China Cancer Marker Academic Conference and the 13th Young Scientists Forum on Cancer Markers. Jiangxi Cancer Hospital; School of Public Health, Nanchang University, 2019:178-179.

- [9] 刘婷婷, 谢小芳, 杜鸿. 耐碳青霉烯类肠杆菌目细菌药敏表型与产碳青霉烯酶型的相关性分析[J]. **中国抗生素杂志**, 2024, 49(10):

1081-1088.

LIU Tingting, XIE Xiaofang, DU Hong. Correlation analysis between drug sensitivity phenotype and carbapenem producing enzyme type of carbapenem-resistant Eenterobacterales coli[J]. **Chinese Journal of Antibiotics**, 2024, 49(10): 1081-1088.

- [10] 刘振嘉, 杨春霞, 毛熠, 等. 肠杆菌目产碳青霉烯酶基因型分析[J]. **分子诊断与治疗杂志**, 2025, 17(2): 362-365.

LIU Zhenjia, YANG Chunxia, MAO Yi, *et al.* Genotyping analysis of carbapenemases produced by Eenterobacterales[J]. **Journal of Molecular Diagnostics and Therapy**, 2025, 17(2): 362-365.