

质谱直接法耐药性检测

明确采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 鉴定耐亚胺培南的鲍曼不动杆菌以及六种 β -内酰胺类抗生素耐药性检测实验程序和相应的操作。

1. 仪器

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS)、培养箱、高压灭菌器、生物安全柜、离心机、移液器、振荡器。

2. 试剂耗材

(1) 仪器校正标准品：可采用不同型号厂家自带校正品，市售校正品进行仪器校正，校正质量范围为 100-1000 Da。

(2) 基质： α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA)。

(3) 色谱级乙醇、甲酸、三氟乙酸、乙腈；18 兆欧超纯水。

(4) 1.5ml 离心管，接种环，废液缸，吸头 (10 μ l、200 μ l、1ml)。

3. 试剂配制

(1) 基质溶解液：超纯水与乙腈按 1:1 的比例混合，加入三氟乙酸 (TFA)，使其在溶液中的浓度为 2.5%，现用现配。

(2) 基质饱和溶液：按需取相应体积的基质溶解液，多次少量加入基质粉末，每次加入后均震荡溶解，直到基质不再溶解后停止加入基质，2000g 离心，上清备用。

(3) 氯化锌储备液 (10mg/mL)：10mg 氯化锌溶于 1mL 超纯水中。

(4) 20mL 10 $\times$ 碳酸氢铵溶液：158.1mg 碳酸氢铵溶于 20mL 超纯水中，充分混合，pH 应为 8~9，无需进一步调整。

(5) 氯化锌工作液：取 1mL 10 $\times$ 碳酸氢铵溶液加入 9mL 水中，加入 10 μ L 氯化锌储备液，配成 10 μ g/mL 氯化锌工作液，混匀。

(6) PBS 溶液：市售 PH7.4 标准溶液或自行配置。

4. 检测流程

(1) 细菌培养：用不同菌株适宜的常规培养基及培养条件培养至对数生长期。

(2) 样本制备

鲍曼不动杆菌亚胺培南耐药检测中，亚胺培南溶于 PBS 溶液中，其他 β-内酰胺类抗生素溶于 10μg/mL 氯化锌工作液中。

将菌株培养到对数生长期，吸取 50μL 抗生素溶液于 1.5mL 离心管中，用 1μL 接种环刮取 3-5 个单克隆(大约 3×10^8 - 6×10^8 /mL)置于有抗生素溶液的离心管中，充分混匀，放于空气浴摇床中，根据抗生素种类不同，按表 3-2-1 中的时间孵育培养。取出培养物，室温 2000 rpm，离心 2min，上清备用。

表 3-2-1 抗生素与细菌作用浓度及时间表

抗生素	浓度	作用时间
Ampicillin 氨苄西林	3mg/mL	2h
Piperacillin 哌拉西林	0.5mg/mL	2h
Cefotaxime 头孢噻肟	0.5mg/mL	2h
Ceftazidime 头孢他啶	0.25mg/mL	3-4h
Ertapenem 厄他培南	0.1mg/mL	2h
Meropenem 美罗培南	1mg/mL	2h
Imipenem 亚胺培南	1mg/mL	2h

(3) 点靶：用移液器吸取 1μl 制备的上清溶液，点到质谱样本靶上，室温自然干燥；吸取饱和基质溶液 1μl 覆盖到靶板上的样本点上，室温自然干燥。

(4) 质谱检测：将样本靶放入质谱中，根据不同型号设备的使用要求进行参数调整及采集数据，并保存到相应的自定义文件中。

5. 结果判定

采用所使用的 MALDI-TOF MS 系统的谱图分析软件提取峰列表或标峰谱图，根据鉴定目的采用对应的检测结果表格判定抗性。

表 3-2-2 鲍曼不动杆菌亚胺培南耐药性检测特征峰

耐药类型	特征峰 (m/z)	备注
------	-----------	----

亚胺培南耐药	300	若谱图 300 处的峰消失则为 亚胺培南耐药
--------	-----	---------------------------

表 3-2-3 β -内酰胺类抗生素敏感与耐药特征峰

	氨苄西林	哌拉西林	头孢噻肟	头孢他啶	厄他培南	美罗培南
	AMP	PIP	CTX	CAZ	ETP	MEM
敏感	349.4	517.5	455.5	546.6	475.5	383.4
	350.4	518.5	456.5	547.6	476.5	384.5
	372.4	540.5	478.5		498.5	406.5
					514.5	
	394.4	562.5			520.5	428.5
					536.5	
耐药			396.5	468.6		
	368.4	536.5			494.5	
	390.4	558.5			516.5	
	412.4	580.5			538.5	
					554.5	
	324.4				450.5	358.5
			414.5	486.6		
			370.5	442.6		
					472.5	380.5
					488.5	