

DOI:10.13350/j.cjpb.220503

• 论著 •

MALDI-TOF MS检测临床复合菌群种及常规方法难鉴定菌种的应用性探讨^{*}

曹庆美^{1,2}, 王鑫¹, 伊茂礼², 王文娟¹, 陈敏¹, 马文汝¹, 张玉梅^{1**}

(1. 滨州医学院, 山东烟台 264000; 2. 烟台毓璜顶医院检验科)

【摘要】 目的 探讨基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)鉴定临床复合菌群种及常规方法难鉴定菌种的应用价值。 **方法** 收集烟台毓璜顶医院2020年1月至2021年9月临床分离的153株非重复复合菌群种及常规方法难鉴定菌种,采用MALDI-TOF MS与16SrRNA两种方法进行菌种鉴定。 **结果** 以16SrRNA测序鉴定作为金标准,MALDI-TOF MS均可将153株复合菌群种及常规方法难鉴定菌种准确鉴定至属水平,一致性为100%。在种水平鉴定上,143株细菌MALDI-TOF MS鉴定结果与16SrRNA测序鉴定的一致性为93.5%。对于复合菌群种,MALDI-TOF MS鉴定鲍曼不动杆菌复合群、洋葱伯克霍尔德复合群的一致性均为100%,阴沟肠杆菌复合群一致性为50%(6/12),并将6株霍氏肠杆菌中的1株错误鉴定为阿氏肠杆菌,其余5株被错误鉴定成阴沟肠杆菌;对于常规方法难鉴定菌种,凝固酶阴性葡萄球菌属、其他不动杆菌属及其他不常见菌属一致性为100%,诺卡菌属一致性为89.5%,棒状杆菌属一致性为77.8%。2株*Appendicis*棒状杆菌和弗雷尼棒状杆菌只鉴定到属水平,2株盖尔森基兴诺卡菌鉴定成豚鼠耳炎诺卡菌。 **结论** MALDI-TOF MS在临床复合菌群种及常规方法难鉴定菌种鉴定中具有操作简便、鉴定准确率高的优点,可用于临床微生物实验室对临床复合菌群种及常规方法难鉴定菌种标本的常规鉴定,为临床抗菌药物的使用提供依据。

【关键词】 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱;16SrRNA;细菌鉴定

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)05-0509-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 May;17(5):509-513, 519.]

Application of MALDI-TOF MS to the identification of clinical composite flora and conventional methods

CAO Qing-mei^{1,2}, WANG Xin¹, YI Mao-li², WANG Wen-juan¹, CHEN Min¹, MA Wen-ru¹, ZHANG Yu-mei¹ (1. Binzhou Medical University, Yantai 264000, Shandong, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Yantai Yuhuangding Hospital) ^{***}

【Abstract】 Objective To explore the application value of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry(MALDI-TOF MS) in identifying clinical and complex group bacteria and conventional methods. **Methods** 153 non repetitive isolates of complex strains or strains difficult to be identified by conventional methods were collected from January 2020 to September 2021 in Yantai Yuhuangding Hospital to explore the application value of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in identifying these stains. MALDI-TOF MS and 16SrRNA sequencing were used for strain identification. **Results** MALDI-TOF MS can accurately identify 153 isolates of complex strains and strains difficult to be identified to the genus level, and the consistency is 100%. In species level identification, MALDI-TOF MS was consistent with 16SrRNA in 143 isolates with a consistency of 93.5%. For complex strains the consistency rate of *Acinetobacter baumannii* complex and *Burkholderia cepacia* complex by MALDI-TOF MS was 100%, and the consistency rate of *Enterobacter cloacae* complex was 50% (6/12). One of the six strains of *Enterobacter hormaechei* was incorrectly identified as *Enterobacter asburiae*, and the other five strains were incorrectly identified as *Enterobacter cloacae*. For species difficult to be identified by conventional methods, the consistency rate was highest (100%) for coagulase-negative *Staphylococcus*, other *Acinetobacter* and other uncommon bacterial genera, followed by *Norcia* (89.5%) and *Corynebacterium* (77.8%). Neither of the two *Corynebacterium appendices* nor *Corynebacterium freneyi* included in this study were accurately identified, only to the genus level, and two *N. cyriacigeorgica* were identified as *N. otitidiscaviarum*. **Conclusion** MALDI-TOF MS has the advantages of simple operation and high identification accuracy in the bacterial species identification, which can be used for

* **【基金项目】** 山东省医药卫生科技发展计划项目(No. 202011001140), 滨州医学院大学生创新创业训练计划项目(No. X202110440156)。

** **【通讯作者】** 张玉梅, E-mail: meiyuzh@163.com

【作者简介】 曹庆美(1989—), 女, 山东烟台人, 本科, 主管检验师, 研究方向为病原生物致病及免疫机制。E-mail: 396775550@qq.com

the routine identification of specimens in the clinical microbial laboratory, providing an accurate and reliable basis for guiding the rational clinical use of antimicrobial drugs.

【Key words】 matrix-assisted laser analysis of ionization time-of-flight mass spectrometry; 16SrRNA; bacterial identification

病原微生物引起的感染性疾病仍为临床面临的难题之一,严重威胁着人类健康。早期发现并准确鉴定病原菌能够及时有效地指导临床合理使用抗生素以改善病人预后,降低滥用抗生素带来的副作用,提高病人的生存率^[1]。传统的细菌鉴定手段因鉴定周期长、范围窄已不足以满足临床诊断的需要。在此基础上,分子生物学方法如 PCR、16SrRNA 测序显著提高了细菌鉴定的时效性和灵敏度,但检测成本高、时间长、对人员技术要求高,仍然难以成为临床常规检测方法^[2]。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)是近年来逐步在临床普及的一种微生物鉴定技术,无需进行常规的革兰染色、氧化酶、触酶和生化反应等试验即可准确检测相对分子质量,具有操作简单、鉴定迅速、灵敏度高等优点^[3]。随着质谱鉴定技术在临床的普及使用,常规生化鉴定技术难以区分的复合群菌种及一些不常见或难鉴定菌种逐渐被予以鉴定,但准确性少有研究报道。本研究旨在对临床分离的复合群菌种及常规方法难鉴定菌种同时应用 MALDI-TOF MS 和 16SrRNA 测序进行鉴定,以探讨质谱技术在复合群菌种及常规方法难鉴定菌种方面的应用价值。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株 烟台毓璜顶医院 2020 年 1 月至 2021 年 9 月期间分离的临床复合群菌种及常规方法难鉴定菌种 153 株(同一患者同一标本类型相同细菌为一次计数)。

1.2 仪器和试剂 哥伦比亚血培养平板(购自郑州安图生物工程股份有限公司),MALDI-TOF MS 质谱仪、96 孔靶板及基质液(德国 Bruker Daltonik 公司),三氟乙酸、甲酸、无水乙醇、乙腈(美国 Sigma-Aldrich 公司),CO₂ 培养箱、二级生物安全柜(美国 Thermo 公司),Alphamager HP 凝胶成像系统(美国 Protein simple 公司),SteadyPure 细菌基因组 DNA 提取试剂盒及 2×Accurate Taq Master Mix(长沙艾科瑞生物工程有限公司)。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 和金黄色葡萄球菌 ATCC25923,均购自卫生部临床检验中心。

2 方法

2.1 菌株的分离培养 严格按照《全国临床检验操作规程》^[4]对临床菌株进行分离与培养,分纯细菌菌落并传代培养出遗传性状稳定的纯菌落用于实验。

2.2 MALDI-TOF MS 质谱鉴定 Eppendorf 管中加入 300 μl 水和 900 μl 乙醇。从平板上挑取 1 个细菌菌落加入到 Eppendorf 管中,混匀后 12 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,留取沉淀。加入 10~50 μl 70%甲酸溶液混匀,再加入 10~50 μl 乙腈混匀,12 000 g 离心 5 min。取 1 μl 上清液在 MALDI 靶板上点样,待自然晾干后添加 1 μl 基质液,自然晾干后放入 MALDI-TOF 质谱仪中检测,利用 Bruker Biotyper 系统将蛋白指纹图谱自动与数据库匹配得出分值用以判定结果。

2.3 16SrRNA 测序鉴定 (1)细菌 DNA 提取:取 200 μl 菌液,100 °C 煮沸 30 min,煮沸后 8 000 r/min (离心半径 10 cm)离心 3 min,吸取上清液至 1.5 ml Eppendorf 管中作为 DNA 模板。(2)PCR 扩增:PCR 反应体系共 25 μl,包括 DNA 模板 2 μl,10 μmol/L 上、下游引物(16S 27F:AGAGTTTGATCCTGGCTCAG;16S 1492R:GGTTACCTTGTTACGACTT)各 1 μl,2×PCR Master Mix 12.5 μl,ddH₂O 8.5 μl。反应条件:95 °C 预变性 2 min;95 °C 变性 30 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s,共 30 个循环;72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 15 g/L 琼脂凝胶电泳后,用凝胶成像系统分析,根据电泳结果判断扩增产物大小。(3)16SrRNA 测序:委托擎科生物有限公司对 PCR 扩增产物进行 16SrRNA 测序,测序结果导入 NCBI 数据库进行比对鉴定细菌。

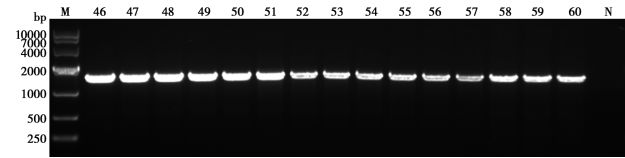
结 果

1 16SrRNA 测序分析

16SrRNA 的 PCR 产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,目的片段约为 1 540 bp,与预期大小相符(图 1)。对 PCR 产物测序,结果见图 2。测序序列导入 NCBI 数据库进行比对鉴定细菌,结果见图 3。

2 MALDI-TOF MS 质谱鉴定

将蛋白指纹图谱导入 Bruker Biotyper 系统与数据库自动匹配得出分值判定结果。判断标准为:分值 ≥2.0 为鉴定到种水平,结果高度可信;分值 1.7~2.0 为鉴定到属水平,结果可信;分值 ≤1.7 为不可信结果(图 4)。



M DNA 标志物(DL 10000) 46~60 受检菌株 N 阴性对照
图 1 细菌 16SrRNA PCR 产物 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析
M DNA Marker 10000 46-60 Tested strains N Negative control
Fig. 1 Bacterial agarose gel electrophoresis

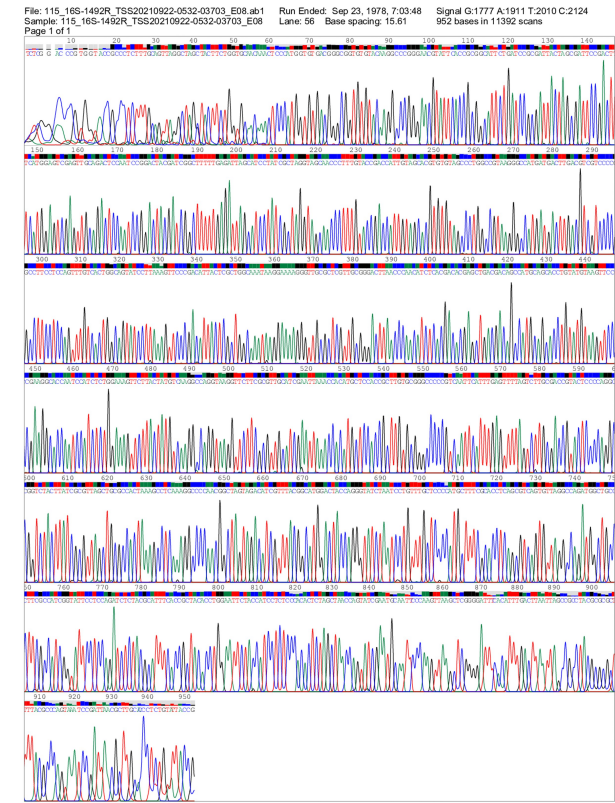


图 2 皮氏不动杆菌核苷酸序列测序结果
Fig. 2 Results of nucleotide sequence sequencing of *Acinetobacter pittii*

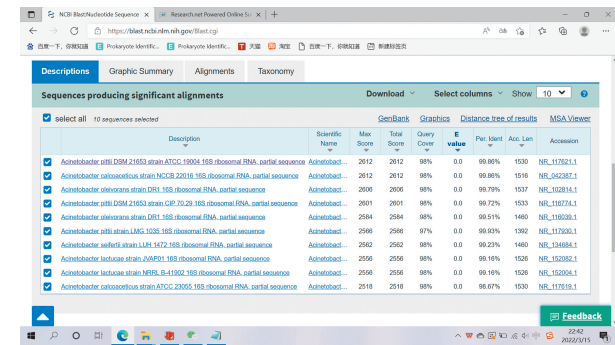


图 3 NCBI 数据库比对结果
Fig. 3 Results of the NCBI database alignment

3 MALDI-TOF MS 质谱鉴定和 16SrRNA 测序结果比较

通过 MALDI-TOF MS 质谱和 16SrRNA 测序两种方法对临床分离的 153 株复合群菌种及常规方法难

鉴定菌种进行鉴定,其中鲍曼不动杆菌复合群 44 株,洋葱伯克霍尔德菌复合群 13 株,阴沟肠杆菌复合群 12 株,凝固酶阴性葡萄球菌属 20 株,棒状杆菌属 9 株,诺卡菌属 19 株,其他不动杆菌属 9 株,其他常规方法难鉴定菌种 27 株。将 16SrRNA 测序结果作为金标准,MALDI-TOF MS 将细菌鉴定至属水平的一致率为 100%。在鉴定种水平方面,MALDI-TOF MS 鉴定结果与 16SrRNA 测序结果一致的为 143 株(93.5%)。对于复合群菌种,MALDI-TOF MS 能够准确鉴定 100%的鲍曼不动杆菌复合群和洋葱伯克霍尔德复合群;对阴沟肠杆菌复合群鉴定准确性较差,只有 6 株(50%)两者鉴定结果一致。84 株常规方法难鉴定菌种,一致率以凝固酶阴性葡萄球菌属、其他不动杆菌属及其他不常见菌属最高(100%),其次是诺卡菌属(89.5%)和棒状杆菌属(77.8%)(表 1)。不能被 MALDI-TOF MS 质谱系统准确鉴定的 10 株细菌中包括 8 株错误鉴定,其中 MALDI-TOF MS 将 6 株霍氏肠杆菌中的 1 株错误鉴定为阿氏肠杆菌,其余 5 株被错误鉴定成阴沟肠杆菌;另将 2 株盖尔森基诺卡菌鉴定成豚鼠耳炎诺卡菌。1 株 *Appendicis* 棒状杆菌和 1 株弗雷尼棒状杆菌均只鉴定到属水平(表 2)。

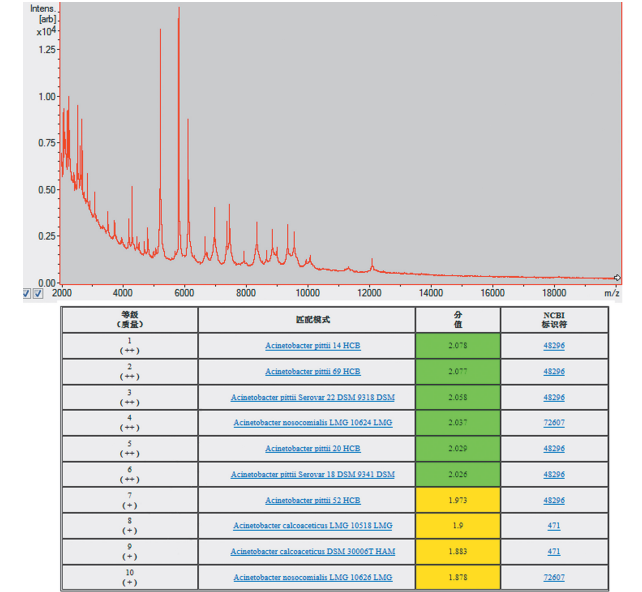


图 4 皮氏不动杆菌蛋白质图谱及结果
Fig. 4 Protein atlas and results of *Acinetobacter pittii*

讨论
激素、广谱抗生素和免疫抑制等的大量使用导致机体免疫功能下降,病原微生物引起的感染逐渐上升。致病菌感染后虽然有相似的临床表现,但是感染的病原体必须明确,才能选择有效的抗菌药物。致病菌的快速、准确鉴定对治疗方案的制定,包括合理使用抗生素等有着重要意义^[5-6]。作为一种新兴的临床微生物

鉴定技术, MALDI-TOF MS 自问世以来给微生物检验带来了历史性突破^[7-9], 已被广泛应用于临床^[10], 如常见病原菌的鉴定, 弥补了传统生化鉴定和分子生物学鉴定的不足^[11-13]。为了探讨 MALDI-TOF MS 鉴定复合群菌种及一些不常见或难鉴定菌种细菌的应用价值, 本研究收集了 153 株临床分离的菌种进行验证。结果表明, 以 16SrRNA 测序鉴定结果为金标准, MALDI-TOF MS 可将 143 株(93.5%)复合群菌种及常规方法难鉴定菌株准确鉴定到种水平, 鉴定一致率较高且具有成本低和鉴定周期短的优势, 与传统鉴定方法相比具有较高的可靠性。

表 1 MALDI-TOF MS 与 16SrRNA 鉴定结果比较
Table 1 Comparison of the identification results of MALDI-TOF MS and 16SrRNA

病原菌 Nosophyte	检测株数 Test the number of strains	MS 鉴定至属水平 MS identification to the genus level		MS 鉴定至种水平 MS identification up to the species level	
		株数 The number of strains	一致率(%) Concordance rate (%)	株数 The number of strains	一致率(%) Concordance rate (%)
复合群菌种					
鲍曼不动杆菌复合群	44	44	100.0	44	100.0
洋葱伯克霍尔德复合群	13	13	100.0	13	100.0
阴沟肠杆菌复合群	12	12	100.0	6	50.0
常规方法难鉴定菌种					
凝固酶阴性葡萄球菌属	20	20	100.0	20	100.0
棒状杆菌属	9	9	100.0	7	77.8
诺卡菌属	19	19	100.0	17	89.5
其他不动杆菌属	9	9	100.0	9	100.0
其他不常见菌属	27	27	100.0	27	100.0
合计 Total	153	153	100.0	143	93.5

表 2 MALDI-TOF MS 系统未准确鉴定菌株
Table 2 Sates were not accurately identified by the MALDI-TOF MS system

菌种名称 Strain name	仅鉴定至属 Only identification to belong	无鉴定结果 No identification results	错误鉴定 Error identification	合计 Total
霍氏肠杆菌	0	0	6 ^{a,b}	6
appendices 棒状杆菌	1	0	0	1
弗雷尼棒状杆菌	1	0	0	1
盖尔森基兴诺卡菌	0	0	2 ^c	2
合计 Total	2	0	8	10

注: ^a 错误鉴定为阿氏肠杆菌, ^b 错误鉴定为阴沟肠杆菌, ^c 错误鉴定为豚鼠耳炎诺卡菌。

复合群细菌随着鉴定技术的发展, 已不再是单一的一种细菌, 而是一群细菌的统称。它由多个基因变种组成, 在遗传物质上密切相关、表型相似^[14], 现已成为临床微生物实验室较为常见的一大类致病菌^[15]。复合群内不同菌种的毒力不同, 对抗生素的耐药性存在明显差异, 对临床的影响也不尽相同。有研究表明, 肺移植受者术前感染新洋葱伯克霍尔德菌的死亡率比感染其他洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种的患者更

高^[16-17]。Lee 等^[18]报道鲍曼不动杆菌引起菌血症相比医院不动杆菌、皮氏不动杆菌感染预后更差。因此将复合群细菌快速准确地鉴定至种水平对临床治疗显得尤为重要。本研究应用 MALDI-TOF MS 从临床分离的 69 株复合群菌种中准确鉴定出 63 株, 鉴定一致率以鲍曼不动杆菌复合群、洋葱伯克霍尔德复合群(100%)最高, 提示 MALDI-TOF MS 可将鲍曼不动杆菌复合群与洋葱伯克霍尔德复合群快速准确地鉴定至种水平, 与文献^[19-21]报道的结果相符。值得注意的是, MALDI-TOF MS 鉴定阴沟肠杆菌复合群的一致率较低(50%), 在不能准确鉴定的 6 株细菌中有 1 株霍氏肠杆菌被错误鉴定为阿氏肠杆菌, 其余 5 株霍氏肠杆菌被错误鉴定成阴沟肠杆菌。这可能与阴沟肠杆菌复合群内不同种之间的相似性高^[22]且蛋白质指纹图谱差异小有关, 导致其质谱信号相似度高难以区分, 因而影响了检测结果。此外不同地区的菌株存在多样性而未被收录到数据库中, 也会对细菌鉴定地准确性产生影响。

通常认为, 凝固酶阴性葡萄球菌是皮肤黏膜的条件致病菌, 当创伤或侵入性治疗使机体免疫力下降时, 某些菌株可成为致病菌。近年来人们逐步认识到凝固酶阴性葡萄球菌是医疗相关病原菌, 是早产儿侵袭性感染中最常见的病原菌^[23]。对于一些不典型的菌株, 常规的生化鉴定方法无法将其准确区分。目前已有文献对 MALDI-TOF MS 鉴定凝固酶阴性葡萄球菌进行研究, 表明 MALDI-TOF MS 与分子鉴定方法具有 100% 的一致率, 与常规生化鉴定系统相比, MALDI-TOF MS 具有明显的优势, 可用于凝固酶阴性葡萄球菌的快速准确鉴定^[24-26]。

临床分离的棒状杆菌作为人体表面定植菌, 对其临床意义的评估往往会有很大困扰, 过去通常被认作污染菌。Bernard 等^[27]报道约 1/2(56 种)的棒状杆菌可引起人类感染, 且部分无枝菌酸棒杆菌、纹带棒杆菌、杰氏棒杆菌、解脲棒杆菌多为多重耐药菌, 因此棒状杆菌的准确鉴定可以为临床抗生素的选择提供有效的依据。本研究在对棒状杆菌属的鉴定中, MALDI-TOF MS 可准确鉴定非发酵棒状杆菌、无枝菌酸棒杆菌及纹带棒状杆菌, 而 2 株 *Appendicis* 棒状杆菌和弗雷尼棒状杆菌未被准确鉴定, 只鉴定到属水平。由于细菌菌株种类繁多, 有的菌株蛋白质指纹图谱并未收录到数据库中, 致使数据库中的蛋白质指纹图谱缺乏, 细菌菌株只能鉴定到属水平或者产生错误的鉴定结果, 影响细菌鉴定的准确性, 需要实验室不断完善和补充数据库, 有报道表明通过自建数据库可将鉴定准确率提高 13%^[28]。

诺卡菌由于其生长速度缓慢、鉴定耗时长等原因

限制了 Vitek 2 Compact 的鉴定能力。不同诺卡菌对抗生素的敏感性不同,诺卡菌如果不能准确鉴定,临床医生只能根据经验用药,极易造成治疗失败,因此实验室对诺卡菌的准确鉴定至关重要^[29]。有报道指出,目前 MALDI-TOF MS 在临床诺卡菌菌种鉴定中发挥着至关重要的作用^[30-32]。在本研究中,19 株诺卡菌有 17 株 MALDI-TOF MS 鉴定结果与 16SrRNA 测序鉴定结果一致,一致率较高。2 株盖尔森基兴诺卡菌被 MALDI-TOF MS 错误鉴定为豚鼠耳炎诺卡菌,而王鹏等^[33]报道 MALDI-TOF MS 对盖尔森基兴诺卡菌的鉴定率为 100%(22/22),推测可能与实验室质谱数据库某个标准蛋白质指纹图谱错误有关,也可能与样本前处理方法、靶板的涂布厚度等原因有关,这些因素均能影响鉴定结果的准确性。

综上所述, MALDI-TOF MS 作为一种新的微生物鉴定技术,具有操作简单、鉴定快速、准确的特点已逐渐普及使用。尽管由于标本数量的原因,有些病原菌只有 1 次鉴定结果以至于无法得出准确可靠的结论,仍需要不断探索,但 MALDI-TOF MS 还是为临床一些特殊的、难鉴定的甚至是重组的新型细菌提供了新的检测手段。相信随着技术的不断发展,质谱技术作为新型的微生物鉴定方法会被越来越多的临床微生物实验室采用,从而提高鉴定准确率改善临床用药模式,解决细菌耐药的全球性难题。

【参考文献】

- [1] 常文君,汪华学. MALDI-TOF MS 对病原菌早期鉴定的临床研究[J]. 包头医学院学报,2020,36(2):12-14.
- [2] Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory[J]. Clin Biochem,2011,44(1):104-109.
- [3] 王军杰,马冰,李轶,等. 质谱技术直接鉴定报阳血培养细菌可行性分析[J]. 检验医学,2020,35(7):716-720.
- [4] 尚红,王毓三,申子瑜. 临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2015:679.
- [5] Edwards T, Sasaki S, Wissiams C, et al. Speciation of common gram-negative pathogens using a highly multiplexed high resolution melt curve assay[J]. Sci Rep,2018,8(1):10-18.
- [6] Tiwari V. Post-translational modification of ESKAPE pathogens as a potential target in drug discovery[J]. Drug Discov Today, 2019,24(3):12-17.
- [7] 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]. Clin Microbiol,2010,48(3):900-907.
- [8] Schulthess B, Brodner K, Bloemberg G V, et al. Identification of gram-positive cocci by use of matrix -assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostics[J]. J Clin Microbiol,2013,51(6):1834-1840.
- [9] Meelvania TE, Shuey S, Winkler DW, et al. Optimizing identification of clinically relevant gram-positive organisms by use of the bruker biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system[J]. J Clin Microbiol, 2013,51(5):1421-1427.
- [10] Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification[J]. J Clin Microbiol Infect, 2010, 16: 1614-1619.
- [11] 王冰,任晓庆,褚美玲,等. MALDI-TOF 质谱仪在临床常见细菌鉴定中的应用[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(16):2228-2230.
- [12] 严立,徐绣宇,张莉萍. 基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱对临床常见细菌和酵母菌的鉴定能力评价[J]. 生物医学工程与临床,2015,19(2):105-108.
- [13] 袁君君. 全自动快速微生物质谱检测系统鉴定流感嗜血杆菌及其可靠性分析[J]. 检验医学与临床,2019,16(11):1555-1557.
- [14] Lu C, Yuan JX, Xu YJ, et al. Comparison of clinical manifestations and antibiotic resistances among three genospecies of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex [J]. PLoS One,2018,13(2):e0191748.
- [15] 孙谦,屈青云,胡燕燕,等. 比较 MALDI-TOF MS 直接涂片法与蛋白提取法鉴定洋葱伯克霍尔德菌群的应用研究[J]. 实用预防医学,2015,22(11):1387-1389.
- [16] Alexander BD, Petzold EW, Reller LB, et al. Survival after lung transplantation of cystic fibrosis patients infected with *Burkholderia cepacia* complex[J]. Am J Transplant,2008(8): 1025-1030.
- [17] Aris RM, Routh JC, LiPuma JJ, et al. Lung transplantation for cystic fibrosis patients with *Burkholderia cepacia* complex[J]. Am J Respir Crit Care Med,2001,164:2102-2106.
- [18] Lee NY, Chang TC, Wu CJ, et al. Clinical manifestations, antimicrobial therapy, and prognostic factors of monomicrobial *Acinetobacter baumannii* complex bacteremia[J]. Infect, 2010, 61:219-227.
- [19] 王穆群,张永. 对一组醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合体细菌的基因型鉴定[J]. 蚌埠医学院学报,2019,44(12):1587-1590.
- [20] 蔡壬辛,蓝锴,屈平华,等. MALDI-TOF MS 对醋酸钙鲍曼不动杆菌复合群菌种的鉴定效果的分析[J]. 临床检验杂志,2020,38(8):617-619.
- [21] 周宏伟,黄永禄,喻华,等. 洋葱伯克霍尔德菌复合群的分子分型和药敏比较[J]. 中华急诊医学杂志,2013,22(12):1429-1432.
- [22] Lin HC, Lu JJ, Lin LC, et al. Identification of a proteomic biomarker associated with invasive ST1, serotype VI group B *Streptococcus* by MALDI-TOF MS[J]. J Microbiol Immunol Infect,2019,52(1):81-89.
- [23] Sgro M, Shah PS, Campbell D, et al. Early-onset neonatal sepsis: rate and organism pattern between 2003 and 2008 [J]. J Perinatol,2011,31:794-798.
- [24] 翟鑫,冯柏娥,张雪静,等. 用 gap 基因和 MALDI-TOF MS 技术对临床常见凝固酶阴性葡萄球菌快速分子鉴定[J]. 转化医学杂志,2019,8(4):237-239.

作用被逆转,细胞焦亡能力上升,提示木犀草素可通过促进 AMPK 表达抑制 NLRP3 激活对 VM 小鼠发挥心肌保护作用。

综上所述,木犀草素可通过激活 AMPK/NLRP3 轴活化发挥对 VM 小鼠的心肌保护作用,增添了临床药物选择库。但木犀草素是一个多功能多靶点药物,其作用机制仍待进一步探讨。

【参考文献】

- [1] Goetzke CC, Althof N, Neumaier HL, et al. Mitigated viral myocarditis in A/J mice by the immunoproteasome inhibitor ONX 0914 depends on inhibition of systemic inflammatory responses in Cocksackievirus B3 infection[J]. Basic Res Cardiol, 2021,116(1):7.
- [2] Zhang XM, Li YC, Chen P, et al. MG-132 attenuates cardiac deterioration of viral myocarditis via AMPK pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2020(126):110091.
- [3] 史家宁, 黄怡可, 秦颖, 等. B 组柯萨奇病毒诱导的细胞焦亡在心肌损伤中的作用[J]. 国际免疫学杂志, 2018, 41(3):256-259.
- [4] El-Rous MA, Saber S, Raafat EM, et al. Dapagliflozin, an SGLT2 inhibitor, ameliorates acetic acid-induced colitis in rats by targeting NF- κ B/AMPK/NLRP3 axis [J]. Inflammopharmacology, 2021, 29(4):1169-1185
- [5] Zhang Y, Ling Y, Yang L, et al. Liraglutide relieves myocardial damage by promoting autophagy via AMPK-mTOR signaling pathway in Zucker diabetic fatty rat[J]. Mol Cell Endocrinol, 2017(448):98.
- [6] 周梦琪, 杨璐平, 马浩洁, 等. 清肺排毒汤干预新冠肺炎细胞因子风暴机制的网络药理学研究[J]. 海南医学院学报, 2020, 26(10):721-729.
- [7] 李远航. 木犀草素防治 COPD 的效果及抗炎机制[J]. 现代医药卫生, 2016, 32(8):1216-1218.
- [8] 娄序笙, 胡京红, 葛东宇, 等. 金银花对病毒性心肌炎小鼠的保护作用及其机制[J]. 中医药学报, 2017, 45(1):37-41.
- [9] 刘方圆, 樊迪, 杨政, 等. 木犀草素对小鼠急性心肌梗死后心肌细胞缺血损伤的保护作用[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2019, 21

- (4):411-415.
- [10] 张翼. AICAR 和 Compound C 减轻内毒素血症肝脏损伤的作用与机制[D]. 南昌:南昌大学医学院, 2013.
- [11] 周俊, 林文静, 林森, 等. AMPK 通过抑制炎症反应减轻小鼠肾脏缺血再灌注后纤维化[J]. 中华肾脏病杂志, 2016, 32(6):450-456.
- [12] 何丽娜, 何素冰, 杨军. 木犀草素体外抗柯萨奇 B3 病毒的作用[J]. 中国现代应用药学, 2000, 17(5):362-365.
- [13] 邓东沅. 木犀草素对流感病毒 H1N1 感染 A549 细胞的作用及免疫调节机制的研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2017.
- [14] 王颖, 洪铭岩, 陈梅, 等. 木犀草素对宫颈癌细胞增殖与迁移能力影响机制探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2020, 27(17):1357-1362.
- [15] 沈瑞明, 马丽辉, 郑颜萍. 木犀草素通过 TLR/MyD88/NF- κ B 通路参与急性痛风性关节炎大鼠的抗炎作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2020, 45(2):115-122.
- [16] 孔艺, 吴红卫, 陈永, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨痰热清注射液治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的机制[J]. 中草药, 2020, 51(7):1785-1794.
- [17] 史有阳, 杨瑞, 张洋, 等. 木犀草素通过 MIEF1 抗 H9c2 心肌细胞损伤的机制研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(5):820-825.
- [18] Song Y, Wu X, Xu YH, et al. HPV E7 inhibits cell pyroptosis by promoting TRIM21-mediated degradation and ubiquitination of the IFI16 inflammasome[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(15):2924-2937.
- [19] Naji A, Muzembo BA, Yagyu KI, et al. Endocytosis of indium-tin-oxide nanoparticles by macrophages provokes pyroptosis requiring NLRP3-ASC-Caspase1 axis that can be prevented by mesenchymal stem cells[J]. Sci Rep, 2016(6):26162.
- [20] Su Q, Lv XW, Xu YL, et al. Exosomal LINC00174 derived from vascular endothelial cells attenuates myocardial Ischemia-Reperfusion injury via p53-mediated autophagy and apoptosis [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021(23):1304-1322.
- [21] Qiu J, Wang M, Zhang J, et al. The neuroprotection of Sinomenine against ischemic stroke in mice by suppressing NLRP3 inflammasome via AMPK signaling [J]. Int Immunopharmacol, 2016(40):492-500.

【收稿日期】 2022-02-18 【修回日期】 2022-05-06

(上接 513 页)

- [25] Payne M, Champaque S, Lowe C, et al. Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification Panel compared to direct MALDI-TOF MS identification for rapid identification of pathogens[J]. J Med Microbiol, 2018, 67(9):1253-1256.
- [26] Angeletti S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry(MALDI-TOF MS) in clinical microbiology[J]. J Microbiol Methods, 2017, 138:20-29.
- [27] Bernard KA, Pecheco AL. In vitro activity of 22 antimicrobial agents against Corynebacterium and Microbacterium species referred to the Canadian National Microbiology Laboratory[J]. Clin Microbiol Newsl, 2015, 37:187-198.
- [28] Couturier MR, Mehinovic E, Croft AC, et al. Identification of HACEK clinical isolates by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(3):138:1104-1106.
- [29] 林宇岚, 陈守涛, 甘龙杰, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪鉴定临床分离菌的应用评估[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(44):3607-3612.

- [30] Khot PD, Bird BA, Durrant RJ, et al. Identification of Nocardia species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(10):3366-3369.
- [31] Toyokawa M, Kimura K, Nishi I, et al. Reliable and reproducible method for rapid identification of Nocardia species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Rinsho Biseibutshu Hinsoku Shindan Kenkyukai Shi, 2013, 24(1):1-8.
- [32] Verroken A, Janssens M, Berhin C, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of Nocardia species[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(11):4015-4021.
- [33] 王鹏, 隗明, 杨春霞, 等. VITEK MALDI-TOF MS 技术在临床分离诺卡菌快速鉴定中的简易流程优化[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(11):989-995.

【收稿日期】 2022-01-11 【修回日期】 2022-03-19