

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2023.15.005

MALDI-TOF MS 在 NTM 临床分离株快速鉴定中的应用研究*

黄琨波¹, 陈桂春², 林玉玲¹, 陈清清¹, 李 科¹, 张建明^{1△}

福建医科大学附属泉州第一医院: 1. 检验科; 2. 心内科, 福建泉州 362000

摘要:目的 建立临床非结核分枝杆菌(NTM)分离株的快速鉴定方法,为临床 NTM 病的诊断和治疗提供参考。方法 收集 2018—2020 年泉州某三甲医院的临床疑似 NTM 感染患者的痰液、肺泡灌洗液、胸部穿刺液和脑脊液等标本,借助基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术,通过改良前处理方法(甲酸提取法),摸索上机检测条件,建立临床 NTM 分离株的快速鉴定方法,并以 16S rRNA 测序为金标准,验证鉴定的准确性。结果 收集的 50 株临床 NTM 菌株,采用传统(常规)处理方法进行质谱鉴定,仅鉴定出 4 株,检出率为 8.0%,而采用甲酸提取法共鉴定出 24 株,检出率为 48.0%,两种方法检出率比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),且改良处理后鉴定出的 24 株鉴定结果与 PCR 测序结果完全一致,符合率为 100.0%。结论 初步建立的 NTM 甲酸提取前处理的质谱鉴定方法检出率明显提高,具有一定的临床应用价值。

关键词:基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱; 非结核分枝杆菌; 鉴定

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)15-2162-05

Application of MALDI-TOF MS in rapid identification of NTM clinical isolates*

HUANG Kunbo¹, CHEN Guichun², LIN Yuling¹, CHEN Qingqing¹, LI Ke¹, ZHANG Jianming^{1△}

1. Department of Laboratory; 2. Department of Cardiology, Quanzhou First Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Quanzhou, Fujian 362000, China

Abstract: **Objective** To establish a rapid identification method for clinical non-tuberculous mycobacterium (NTM) isolates and provide reference for the diagnosis and treatment of clinical NTM disease. **Methods** Samples such as sputum, alveolar lavage fluid, chest puncture fluid, and cerebrospinal fluid were collected from patients with clinically suspected NTM infection in 2018—2020 in a tertiary hospital of Quanzhou, China. With the help of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) technology, a rapid identification method of clinical NTM isolates was established by improving the pretreatment method (the improved formic acid extraction method) and exploring the detection conditions. The accuracy of identification was verified by 16S rRNA sequencing as the gold standard. **Results** Among the 50 clinical NTM strains collected, only 4 strains were identified by mass spectrometry using the traditional (conventional) treatment method with detection rate of 8.0%, while 24 strains were identified by mass spectrometry using the improved formic acid extraction method after pretreatment with detection rate of 48.0%. The difference of detection rate between the two methods was statistically significant ($P < 0.01$), and the identification results of the 24 strains identified by the improved treatment were completely consistent with the sequencing results of PCR, with compliance rate of 100.0%. **Conclusion** The detection rate of the mass spectrometric identification method of NTM formic acid pretreated substance is significantly improved, which has certain clinical application value.

Key words: MALDI-TOF MS; non-tuberculous mycobacterium; identification

非结核分枝杆菌(NTM)病是指人体感染了 NTM 引起相关组织或脏器的病变。NTM 肺病与肺结核有着类似的临床症状和影像特征,二者无法通过

痰标本抗酸染色进行区分,常造成误诊^[1]。目前可以通过胶体金和荧光 PCR 检测等手段初步排除结核菌的感染,但仍无法明确诊断 NTM 病,更无法区分至

* 基金项目:福建省卫生健康中青年骨干人才培养项目(2020GGA075);福建省泉州市科技计划项目(2021N059S)。

作者简介:黄琨波,男,主管技师,主要从事临床医学检验方面的研究。△ 通信作者, E-mail: 0591350004@163.com。

亚种,误诊率也较高。滞后的鉴定技术严重阻碍了 NTM 病的诊治^[2]。由于诊断困难、高度耐药且容易复发,近年来我国 NTM 病的发病率明显上升,对人类健康构成极大的威胁^[3]。

NTM 传统培养方法操作繁杂,培养周期长,可重复性差,加之分枝杆菌大多属于慢生长菌,培养条件较苛刻,不易生长,已无法满足临床实际工作的需求^[3]。近年来,基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术在临床微生物鉴定中的应用日渐广泛。MALDI-TOF MS 与传统方法和分子生物学技术相比,具有快速、准确、灵敏及经济等优点,尽管不能完全替代传统培养方法,但也弥补了传统方法操作复杂、费时等不足^[4-5]。MALDI-TOF MS 技术在国内用于 NTM 的鉴别较少见,因此临床参考数据较为有限^[6]。本研究拟通过优化质谱上机前处理条件,建立适用于临床的 NTM MALDI-TOF MS 鉴定方法。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2018—2020 年泉州某三甲医院微生物实验室的部分临床疑似 NTM 感染(涂片抗酸染色阳性,分离培养并经结核 DNA 检测为阴性,初步鉴为 NTM)患者的痰液、肺泡灌洗液、胸部穿刺液和脑脊液等样本。采用改良罗氏培养基(L-J 培养基)进行分离培养。NTM 参考株来源于美国菌种保藏中心。

1.2 仪器与试剂 主要仪器:全自动快速生物质谱检测系统(Bruker Daltonik GmbH);基因扩增仪(杭州博日科技有限公司);二氧化碳培养箱(赛默飞世尔科技公司)。主要试剂:基质液;甲酸水溶液;乙腈水溶液;无水乙醇;固体培养基;哥伦比亚血琼脂平板;PCR 试剂盒、Ex Taq DNA 聚合酶及标准分子量 DNA(Marker)购自 TaKaRa 公司。

1.3 方法

1.3.1 传统(常规)质谱法

1.3.1.1 临床标本前处理 (1)痰标本:首先将痰样本转移至螺口管中,视样本具体性状,在生物安全柜内加入 1~2 倍体积的 N-乙酰-L-半胱氨酸-氢氧化钠(NALC-NaOH)处理液。旋紧盖子,在涡旋振荡器上涡旋振荡充分混匀,静置 15 min。小心打开盖子,加入适量磷酸盐缓冲液(pH 值为 6.8)至总体积约 40 mL;3 000×g 离心 20 min,弃上清液用 1 mL 磷酸盐缓冲液重悬沉淀,并将重悬液接种至新的培养基上。(2)支气管灌洗液、脑脊液等无菌体液:直接将样本离心后取沉淀接种进行培养。

1.3.1.2 NTM 菌株筛选 将经 Bactec MGT960 系

统培养阳性的分枝杆菌菌液接种于罗氏培养基上,37℃持续培养 4 周,记录菌落的生长状态。其中,经结核 DNA 检测呈阴性的初步判定为 NTM。

1.3.1.3 菌株 DNA 提取 采用煮沸裂解法进行菌株 DNA 的提取。

1.3.2 MALDI-TOF MS 改良前处理(甲酸提取法)

1.3.2.1 标本处理 (1)在 1.5 mL 的离心管中先加入 300 μ L 去离子水;转移分枝杆菌样本到上述离心管中(避免取到培养基,尽可能转移 1~3 份 10 μ L 接种环的菌量。取菌量更直观的概念:离心管中 2 μ L 水的量代表一小份沉淀,5 μ L 的量代表合适大小的沉淀);煮沸 30 min 以灭活分枝杆菌(可使用 95℃的金属浴或水浴)。(2)使用移液枪反复吹打混匀,然后涡旋振荡至少 1 min,在离心管中形成悬液。(3)添加 900 μ L 的无水乙醇溶液,然后悬液振荡至少 1 min。(4)离心菌体细胞(离心 2 min,13 000 r/min)并吸净上清液。(5)将第 4 步重复一次,使用移液枪小心吸取剩下的乙醇,以完全除去乙醇溶液。(6)将 10 μ L 70%甲酸水溶液加入沉淀物中,通过移液枪反复吹打,然后进行涡旋充分混匀,(7)加入 10 μ L 乙腈,通过移液枪反复吹打混合悬液。(8)离心细菌提取物(离心 2 min,13 000 r/min)。

1.3.2.2 MALDI-TOF MS 测定 参考质谱仪的操作说明进行。

1.3.3 16S rRNA 测序

1.3.3.1 PCR 扩增 参考文献[7]合成 16S rRNA 基因的引物,引物均由上海生工生物有限公司合成。PCR 体系 50 μ L,2xTaq MasterMix 25 μ L,DNA 模板 5 μ L,引物(10 pmol/L)各 1 μ L,ddH₂O 18 μ L。阳性对照为标准株,阴性对照组为 ddH₂O。PCR 反应条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 1 min,60℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,第 2~4 步 30 个循环,最后 72℃充分延伸 10 min。将配好的体系放置到 PCR 仪中进行 PCR 反应。

1.3.3.2 PCR 序列分析 扩增产物经电泳检测验证后,取 20 pmol/L 扩增产物送往上海生工生物技术有限公司进行纯化及测序。将基因序列分析结果与 GenBank 中分枝杆菌标准序列进行比对,相似度最高的菌种为标本所属菌种。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析。计数资料以例数或百分比表示,采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 标本收集基本情况 本研究共收集临床微生物实验室初步鉴定为 NTM 的标本 50 例,以呼吸内科、

感染科、ICU 和发热门诊来源的标本较为常见。将已有标本转种于固体培养基上,以获取单个菌落用于后续实验分析。

2.2 传统(常规)质谱方法与甲酸提取法的鉴定结果比较 用传统(常规)质谱方法共鉴定出 4 例菌株,检出率为 8.0%(4/50),包括脓肿分枝杆菌 3 例和鸟分

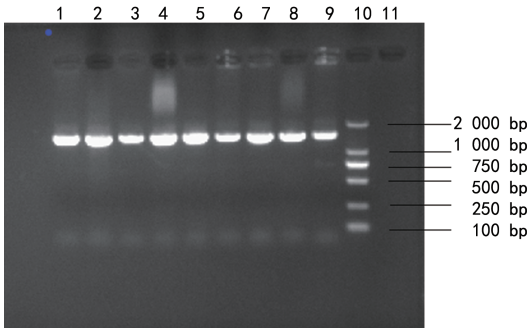
枝杆菌 1 例。采用甲酸提取法共鉴定出 24 株菌株,检出率为 48.0%(24/50),鉴定结果见表 1。在 26 株未能鉴定出结果的菌株中,有 6 株的蛋白指纹图谱具有良好波谱谱峰。两种方法检出率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 甲酸提取法鉴定结果

序号	编号	菌种结果	鉴定分值	序号	编号	菌种结果	鉴定分值
1	6200801	鸟分枝杆菌	2.127	13	6210204	胞内分枝杆菌	2.000
2	6200116	鸟分枝杆菌	1.834	14	6210029	胞内分枝杆菌	1.985
3	6210220	堪萨斯分枝杆菌	2.114	15	6200786	胞内分枝杆菌	1.415
4	6201512	脓肿分枝杆菌	2.099	16	6201039	胞内分枝杆菌	1.487
5	6201374	鸟分枝杆菌	1.648	17	6201751	胞内分枝杆菌	1.603
6	6201383	脓肿分枝杆菌	1.837	18	6201069	胞内分枝杆菌	1.977
7	6201659	脓肿分枝杆菌	1.947	19	6201178	马赛分枝杆菌	1.446
8	6201635	脓肿分枝杆菌	2.035	20	6201237	堪萨斯分枝杆菌	1.998
9	6200949	福特分枝杆菌	1.339	21	6201628	隐藏分枝杆菌	1.467
10	6200961	哥伦比亚分枝杆菌	1.414	22	6201388	拟杆菌分枝杆菌	1.983
11	121030607	猿分枝杆菌	1.947	23	6201753	马赛分枝杆菌	1.514
12	6210501	产粘液分枝杆菌	2.012	24	6201842	马赛分枝杆菌	1.743

2.3 16s rRNA 基因测序结果

2.3.1 16s rRNA 基因扩增 将甲酸提取法处理后有鉴定结果的菌株,采用加热裂解法提取核酸,以 16S F、16S R 作为引物进行 16 s rRNA 基因扩增,分 2 批次扩增,第 1 次扩增 10 株,第 2 次扩增 14 株,共扩增了 24 株菌株,凝胶电泳结果表明全部有明亮的目的基因扩增条带出来,选用 Mark 分子量大小约为 2.0 kb,目的核酸片段分子量约为 1.5 kb,电泳条带 1.0~2.0 kb,符合试验预期。部分凝胶电泳条带见图 1。



注:1~9 为菌株扩增结果(约 1 500 bp);10 为相对分子质量标准 DL 2000;11 为阴性对照。

图 1 16s rRNA 基因扩增凝胶电泳结果

2.3.2 测序结果分析 将甲酸提取法处理后有鉴定结果的菌株的扩增产物送上海生物技术公司进行测序,通过 GenBank 进行 Blast 比对,结果显示 24 株均

为 NTM,结果与质谱鉴定完全一致,符合率为 100.0%,其中胞内分枝杆菌 6 株,马赛分枝杆菌 3 株,脓肿分枝杆菌 4 株,哥伦比亚分枝杆菌 1 株,鸟分枝杆菌 3 株,福特分枝杆菌 1 株,堪萨斯分枝杆菌 2 株,拟杆菌分枝杆菌 1 株,隐藏分枝杆菌 1 株,产黏液分枝杆菌 1 株,猿分枝杆菌 1 株。

3 讨 论

NTM 毒性弱于结核分枝杆菌,大多是机会性致病菌,感染范围广,但临床普遍耐药,治疗方案存在较大差异。近年来,NTM 感染率和发病率逐渐增加,其潜在危害越来越受到重视^[3]。全球性的结核病高负担国家中,我国的情况一直不容乐观。

临床患者中发生联合耐药的概率在升高,且具有广泛的耐药率^[8-10]。因此临床实验室中快速、准确地鉴定 NTM 就显得极为迫切。传统生化方法可以用于鉴别 MTBC 和 NTM,却无法避免操作烦琐、实验周期长的缺陷,生化培养以细菌生长特点和生化反应为依据作出判断,本身存在一定的局限性。近年来,分子诊断技术已经得到全面发展,PCR、PCR 直接测序法、限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)已成为较常用的鉴定结核分枝杆菌的方法^[11]。

有文献报道 PCR-核酸探针技术,能有效鉴别 23 种临床常见分枝杆菌;PCR 单链构象多态性(PCR-

SSCP)分析技术、荧光定量 PCR(qPCR)技术等,能够对特定的一种或多种 NTM 进行快速鉴定,极大地丰富了临床分枝杆菌鉴定实验方法;基因芯片技术即 cDNA 微阵列芯片,能够对临床常见 20 种 NTM 进行快速鉴定^[12]。这些分子生物学技术虽可以快速诊断 NTM,但局限于特定的一些分枝杆菌,而且费用高,操作难度较大,对实验室检验人员要求较高,测序引物又因方案不同而变动,引物扩增长度没有达到一定要求,也很难鉴定出相应菌种,难以做到统一操作,故此,探索新的更为简便、快速、准确的鉴定方法对临床工作意义重大。

质谱方法是近年快速发展的一种生物质谱技术,具有极大的潜在价值^[13-15]。MALDI-TOF MS 技术的基本原理是获取细菌蛋白质,形成质量图谱。国内已有 MALDI-TOF MS 技术应用于细菌分型、耐药分析的相关文献报道,充分显示了其巨大的应用价值。但国内目前 MALDI-TOF MS 在分枝杆菌鉴定的应用中还未达到预期效果,使 NTM 在质谱鉴定方面远落后于细菌。本研究中依照布鲁克公司的操作标准,检出率仅为 8.0%(4/50),而采用改良前处理方法(甲酸提取法)后检出率为 48.0%(24/50),差异有统计学意义($P<0.01$)。NTM 细胞壁中蜡质成分占 60%以上,可抵抗机体免疫力和药物的攻击,同时能耐受搅拌,不易破碎,因此,传统方法不易使其细胞壁破碎释放出蛋白质形成图谱^[16-17]。而采用改良的甲酸提取法后,甲酸能有效地诱导细胞壁破裂,使得细菌缓慢释放出细胞质中的蛋白,从而提升质谱的鉴定效率^[18-19]。本研究表明改良前处理方法后的质谱技术用于 NTM 鉴定,与传统的质谱鉴定方法比较检出率更高;且与传统微生物临床鉴定相比同样具有质谱本身的经济、快速等优点。因此,用于鉴别 NTM 与结核分枝杆菌复合群,一定程度上能够满足临床工作中 NTM 快速鉴定的需求,对于临床 NTM 菌种鉴定有一定的应用价值。

标准数据库的菌株库存容量是影响质谱鉴定的一个重要因素^[20-21]。本研究中发现,采用甲酸提取法时,在 26 株未能鉴定出结果的菌株中,有 6 例菌株质谱鉴定图谱峰值比较理想,但却没有明确结果,分析原因可能是由于本实验室数据库不够全面,没有对应的标准菌株,从而导致质谱鉴定结果失败。另一个影响因素就是乙腈溶液和甲酸溶液的稀释浓度偏低,对蛋白酸化和提取产生影响。除此之外的一个决定性的实验因素是细菌细胞壁坚实,常规实验手段难以破坏细菌细胞壁,导致细菌蛋白质获取困难,甚至蛋白质基本没有提取出来,以致实验分析失败。本研究采

用了加热、加酸、加生物酶等方法,以提高蛋白质含量,不过效果并不理想,因此需要探索破除细菌细胞壁的新方法。

MALDI-TOF MS 技术用于 NTM 鉴定的临床价值,仍有待于未来大量样本的研究分析给予更为客观和科学的评价。本课题在研究过程中,收集标本相对有限,后续研究工作将进一步继续深入开展下去,以期探索出更加准确、可靠、快速的 NTM 鉴定技术。综上所述, MALDI-TOF MS 技术用于 NTM 鉴定及分型,具有实际的应用价值,可用于临床实验室检验工作。

参考文献

- [1] BIET F, BOSCHIROLI M L. Non-tuberculous mycobacterial infections of veterinary relevance[J]. Res Vet Sci, 2014, 97: 69-77.
- [2] GRIFFITH D E, AKSAMIT T, BROWN-ELLIOTT B A, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 175 (4): 367-416.
- [3] OLIVA E, AROSIO M, MAZZOLA E, et al. Rapid identification of non-tuberculous mycobacteria with MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Infez Med, 2021, 29(1): 79-84.
- [4] 周昭彦, 胡必杰, 鲍容, 等. MALDI-TOF 质谱快速鉴定非结核分枝杆菌方法的建立和评价[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(7): 610-614.
- [5] 中华医学会结核病学分会, 非结核分枝杆菌病实验室诊断专家共识编写组. 非结核分枝杆菌病实验室诊断专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(6): 438-443.
- [6] SHAMAEI M, MIRSAEIDI M. Nontuberculous mycobacteria, macrophages, and host innate immune response[J]. Infect Immun, 2021, 89(8): e0081220.
- [7] KIM S H, SHIN J H. Identification of nontuberculous mycobacteria using multilocus sequence analysis of 16S rRNA, hsp65, and rpoB[J]. J Clin Lab Anal, 2018, 32(1): e22184.
- [8] JOHANSEN M D, HERRMANN J L, KREMER L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of Mycobacterium abscessus[J]. Nat Rev Microbiol, 2020, 18(7): 392-407.
- [9] DE ZWAAN R, VAN INGEN J, VAN SOOLINGEN D. Utility of rpoB gene sequencing for identification of non-tuberculous mycobacteria in the Netherlands[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(7): 2544-2551.
- [10] VAN INGEN J. Microbiological diagnosis of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease[J]. Clin Chest Med, 2015(36): 43-54. (下转第 2169 页)

节纤维蛋白溶解的过程,进而促进血栓形成并抑制血栓的降解和重塑^[10]。本研究中,模型组、NR4A1 组大鼠血清 NO、eNOS、6-keto-PGF1 α 水平及 NO/ET-1 均低于对照组 ($P < 0.05$),且模型组均低于 NR4A1 组 ($P < 0.05$);模型组、NR4A1 组大鼠血清 ET-1、PAI-1、TXB2 水平及 TXB2/6-keto-PGF1 α 均高于对照组 ($P < 0.05$),且模型组均高于 NR4A1 组 ($P < 0.05$)。提示 NR4A1 可上调 NO、eNOS、6-keto-PGF1 α 水平及 NO/ET-1,下调 ET-1、PAI-1、TXB2 水平及 TXB2/6-keto-PGF1 α ,进而减轻大鼠颈动脉血栓模型中的血栓和炎症。

综上所述,NR4A1 对 NF- κ B/COX-2 信号通路相关蛋白表达具有负向调控作用,进而减轻大鼠深静脉血栓模型中的血栓和炎症,为临床血栓栓塞性疾病的治疗提供了新的思路和策略。

参考文献

- [1] 魏安华,贡雪芃,李志勤,等. 选择性凝血因子 XIa 抑制剂防治血栓性疾病的临床研究进展[J]. 中国新药杂志, 2022,31(17):1707-1711.
- [2] NUS M, BASATEMUR G, GALAN M, et al. NR4A1 deletion in marginal zone b cells exacerbates atherosclerosis in mice-brief report[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020,40(11):2598-2604.
- [3] 田坤,孟路阳,陈世伟. 利伐沙班对下肢动脉硬化闭塞症大鼠血管内皮功能及 p38MAPK/NF- κ B 通路的影响[J]. 中国药师,2018,21(05):757-760.
- [4] MIAO L, YANG Y, LIU Y, et al. Glycerol kinase interacts with nuclear receptor NR4A1 and regulates glucose metabolism in the liver[J]. FASEB J, 2019,33(6):6736-6747.
- [5] YE T, PENG J, LIU X, et al. Orphan nuclear receptor TR3/Nur77 differentially regulates the expression of integrins in angiogenesis[J]. Microvasc Res, 2019,122:22-33.
- [6] LI P, BAI Y, ZHAO X, et al. NR4A1 contributes to high-fat associated endothelial dysfunction by promoting CaMKII-Parkin-mitophagy pathways[J]. Cell Stress Chaperones, 2018,23(4):749-761.
- [7] 郭阆廷,石锦,陈曦,等. COX-2 靶向干扰对大鼠创伤性深静脉血栓形成的影响[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2022,19(1):11-14.
- [8] OU M, ZHANG Y, CUI S, et al. Upregulated miR-9-5p protects against inflammatory response in rats with deep vein thrombosis via inhibition of NF- κ B p50[J]. Inflammation, 2019,42(6):1925-1938.
- [9] 董泉彬,唐燕华,王维雪,等. 心房颤动患者心房组织 FGF23/FGFR4 表达与心房纤维化的相关性[J]. 中华医学杂志, 2018,98(13):1003-1007.
- [10] 李帅,金爱莲,刘青,等. Cys C、PAI-1 与急性心肌梗死的早期诊断及疾病严重程度的相关性分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2022,14(11):1968-1971.
- [11] LIU W, LIU S, LI P, et al. Retinitis pigmentosa: progress in molecular pathology and biotherapeutic strategies [J]. Int J Mol Sci, 2022,23(9):4883.
- [12] BARIS A, BAYRAKTAR B. Identification of the mycobacterial strains isolated from clinical specimens using hsp65 PCR-RFLP method[J]. Sisli Etfal Hastan Tip Bul, 2020,54(3):364-370.
- [13] 黄永红. 非结核分枝杆菌感染的实验诊断应用进展[J]. 实用医技杂志, 2013,20(1):44-46.
- [14] PATEL R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases[J]. Clin Chem, 2015,61(1):100-111.
- [15] CROXATTO A, PROD' HOM G, GREUB G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology[J]. FEMS Microbiol Rev, 2012,36(2):380-407.
- [16] RINDI L, PUGLISI V, FRANCONI I, et al. Rapid and accurate identification of nontuberculous mycobacteria directly from positive primary MGIT cultures by MALDI-TOF MS[J]. Microorganisms, 2022,10(7):1447.
- [17] LI B, ZHU C, SUN L, et al. Performance evaluation and clinical validation of optimized nucleotide MALDI-TOF-MS for mycobacterial identification[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022,12:1079184.
- [18] BAGNARINO J, BARBARINI D, RUSSELLO G, et al. Mycobacterium chimaera identification using MALDI-TOF MS technology: a practical approach for the clinical microbiology laboratories[J]. Microorganisms, 2022,10(6):1184.
- [19] PASTRONE L, CURTONI A, CRISCIONE G, et al. Evaluation of two different preparation protocols for MALDI-TOF MS nontuberculous mycobacteria identification from liquid and solid media[J]. Microorganisms, 2023,11(1):120.
- [20] MOUSSA M, CAUVIN E, LE PIOUFFLE A, et al. A MALDI-TOF MS database for fast identification of Vibrio spp. potentially pathogenic to marine mollusks[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2021,105(6):2527-2539.
- [21] HONNAVAR P, GHOSH A K, PAUL S, et al. Identification of malassezia species by MALDI-TOF MS after expansion of database[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2018,92(2):118-123.

(收稿日期:2023-02-03 修回日期:2023-06-10)

(上接第 2165 页)

- [11] LIU W, LIU S, LI P, et al. Retinitis pigmentosa: progress in molecular pathology and biotherapeutic strategies [J]. Int J Mol Sci, 2022,23(9):4883.
- [12] BARIS A, BAYRAKTAR B. Identification of the mycobacterial strains isolated from clinical specimens using hsp65 PCR-RFLP method[J]. Sisli Etfal Hastan Tip Bul, 2020,54(3):364-370.
- [13] 黄永红. 非结核分枝杆菌感染的实验诊断应用进展[J]. 实用医技杂志, 2013,20(1):44-46.
- [14] PATEL R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases[J]. Clin Chem, 2015,61(1):100-111.
- [15] CROXATTO A, PROD' HOM G, GREUB G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology[J]. FEMS Microbiol Rev, 2012,36(2):380-407.
- [16] RINDI L, PUGLISI V, FRANCONI I, et al. Rapid and accurate identification of nontuberculous mycobacteria directly from positive primary MGIT cultures by MALDI-TOF MS[J]. Microorganisms, 2022,10(7):1447.
- [17] LI B, ZHU C, SUN L, et al. Performance evaluation and clinical validation of optimized nucleotide MALDI-TOF-

(收稿日期:2022-12-20 修回日期:2023-06-10)